

Sensitivierung von Melanomzellen für die TRAIL-induzierte Apoptose mittels Kinaseinhibitoren

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt – Universität zu Berlin

von

Diplom-Biologin Anja Berger

Präsident der Humboldt - Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch - Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Stefan Hecht, Ph.D.

Gutachter: 1. Prof. Wolfgang Uckert
 2. PD Dr. Jürgen Eberle
 3. Prof. Christoph Geilen

Tag der mündlichen Prüfung 07.06.2013

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG.....	5
ABSTRACT	7
1 EINLEITUNG.....	9
1.1 Das Maligne Melanom	9
1.1.1 Epidemiologie und Progression	9
1.1.2 Klinische Charakteristika des frühen Melanoms und Arten des Melanoms	9
1.1.3 Einteilung der Stadien und Prognose	11
1.1.4 Behandlung des malignen Melanoms	12
1.2 Der programmierte Zelltod - Apoptose.....	13
1.2.1 Nekrose im Vergleich zur Apoptose	14
1.2.2 Signalwege der Apoptose	15
1.2.2.1 Der extrinsische Signalweg	16
1.2.2.2 Der intrinsische Signalweg	17
1.2.3 Apoptoseregulation durch die Bcl-2-Proteinfamilie	18
1.3 Caspasen.....	21
1.3.1 Rolle der Caspasen in der Apoptose	21
1.3.2 Caspaseinhibitoren	23
1.4 TRAIL	25
1.4.1 TRAIL und seine Rezeptoren	25
1.4.2 Aktivierung verschiedener Signalwege	26
1.4.3 Anwendung von TRAIL in der Tumorthherapie	27
1.4.4 Resistenzentwicklung	29
1.5 Die Signalgebung von NF-κB	30
1.6 Proteinkinase-Inhibitoren	32
1.6.1 Proteinkinasen	32
1.6.2 Kinaseinhibitoren	33
1.7 Fragestellung	36

2 ERGEBNISSE	37
2.1 Melanomzellkulturmodell von der TRAIL-Resistenz.....	37
2.2 Sensitivierung für die TRAIL-induzierte Apoptose mittels des Multikinaseinhibitors	
Indirubin 8-Rha-β.	38
2.2.1 Effekte von Indirubin 8-Rha- β	38
2.2.2 Indirubin sensitiviert für die Todesliganden-induzierte Apoptose.....	39
2.2.3 Volle Caspasenaktivierung in der Kombination von Indirubin mit TRAIL	42
2.2.4 Aktivierung des mitochondrialen Signalweges in der Kombination von Indirubin mit TRAIL.....	44
2.2.5 Indirubin überwindet die Apoptoseresistenz von Bcl-2	46
2.2.6 Effekte von Indirubin auf die Bcl-2-Proteine und die cIAPs	48
2.2.7 Effekte von Indirubin auf die Todesrezeptoren und p53	49
2.3 Sensitivierung für die TRAIL-induzierte Apoptose mittels dem Kinaseinhibitor BMS-345541	52
2.3.1 Direkte Effekte von BMS-345541 auf die Apoptose und die NF- κ B-Aktivierung	52
2.3.2 Sensitivierung für die Todesliganden-induzierte Apoptose mittels BMS-345541	54
2.3.3 Involvierung der Caspasen in der Kombination von BMS-345541 mit TRAIL	57
2.3.4 Entscheidende Rolle von Bcl-2 und Bax bei der TRAIL-induzierten Apoptose mittels BMS-345541	60
2.3.5 Kritische Rolle von Smac und Bid bei der TRAIL-induzierten Apoptose mittels BMS-345541	62
2.3.6 Aktivierung von Bax mittels BMS-345541 durch Phosphorylierung	65
2.4 Sensitivierung für die TRAIL-induzierte Apoptose mittels des Kinaseinhibitor L-779,450	69
2.4.1 Die direkten Effekte von L-779,450	69
2.4.2 Sensitivierung für die TRAIL-induzierte Apoptose mittels L-779,450	71
2.4.3 Aktivierung des mitochondrialen proapoptotischen Signalweges in der L-779,450/TRAIL-vermittelten Apoptose	73
2.4.4 Die entscheidende Rolle von Bcl-2 und Bax in der L-779,450/TRAIL-vermittelten Apoptose	75
2.4.5 Induktion der Bim-Expression durch L-779,450	77
3 DISKUSSION	78
3.1 Bedeutung von TRAIL für das Melanom	78

3.2 Sensitivierung für die TRAIL-induzierte Apoptose durch 8-Rha-β	79
3.2.1 Überwindung der Todesliganden-Resistenz durch das Indirubin 8-Rha-β	79
3.2.2 Mechanismen in der Indirubin-vermittelten TRAIL-Sensitivierung	80
3.3 Sensitivierung für die TRAIL-induzierte Apoptose mittels BMS-345541	82
3.3.1 Die Wirkung von BMS-345541 auf Melanomzellen	82
3.3.2 TRAIL-Sensitivierung von Melanomzellen durch BMS-345541	82
3.3.3 Mitochondrial-abhängige TRAIL-Sensitivierung durch BMS-345541	83
3.3.4 Der Einfluss von Bid und Bax auf die BMS-345541-vermittelte TRAIL-Sensitivierung	84
3.4 Sensitivierung für die TRAIL-induzierte Apoptose durch den pan-RAF-Inhibitor L-779,450	87
3.4.1 TRAIL-Sensitivierung von Melanomzellen durch L-779,450	87
3.4.2 Mechanismen der L-779,450-vermittelten TRAIL-Sensitivierung	87
3.5 Fazit	89
4 MATERIAL UND METHODEN	91
4.1 Zelllinien und Zellkultivierung	91
4.1.1 Zelllinien	91
4.1.2 Zellkultivierung	91
4.2 Verwendete agonistische Antikörper	92
4.3 Verwendete Reagenzien	92
4.4 Molekularbiologische Methoden	92
4.4.1 Proteinanalytik	92
4.4.1.1 Herstellung von Proteinextrakten mit Standard-Lysepuffer	93
4.4.1.2 Herstellung von Proteinextrakten mit Phospho-Lysepuffer	93
4.4.1.3 Verwendete Puffer und Reagenzien für Standard- und Phospho-Lysepuffer	93
4.4.1.4 Konzentrationsbestimmung mittels BCA-Methode	94
4.4.1.5 Elektrophorese - Protokoll	94
4.4.1.6 Verwendete Puffer und Reagenzien für die Elektrophorese	95
4.4.1.7 Protein-Transfer-Protokoll	95
4.4.1.8 Verwendete Puffer und Reagenzien für Protein-Transfer-Protokoll	96
4.4.1.9 Enhanced Chemilumineszenz (ECL)	96
4.4.1.10 Verwendete Puffer und Reagenzien für ECL	96
4.4.1.11 Verwendete Antikörper für Westernblot-Analyse	96

4.4.1.12 Herstellung von Zellfraktionierungslysaten	97
4.5 Zellbiologische Methoden	98
4.5.1 Durchflusszytometrie	98
4.5.2 Oberflächenexpression - Rezeptoren	99
4.5.3 Blockierungsexperimente - Rezeptoren	99
4.5.4 Nachweismethoden – Apoptose	99
4.5.4.1 Propidiumjodid-Färbung	99
4.5.4.2 Bisbenzimid-Färbung	100
4.5.5 Nachweismethode - Zytotoxizität	100
4.5.6 Wachstumskurven	101
4.5.7 Nachweismethode - mitochondriales Membranpotential ($\Delta\psi_m$)	102
4.5.8 Nachweismethode - Zellvitalität	102
4.5.9 NF- κ B Bindungsnachweis	102
4.5.10 Nachweismethode Bax-Aktivierung	103
4.5.11 Nachweismethode Bax-Phosphorylierung mittels Durchflusszytometrie	104
4.6 Statistische Auswertung	104
LITERATURVERZEICHNIS	105
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	123
PUBLIKATIONSLISTE	126
KONGRESSBEITRÄGE	127
DANKSAGUNG	128
EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	129

Zusammenfassung

Derzeit gibt es keine wirksame Therapie gegen das maligne Melanom. Der Todesligand TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) erscheint als eine vielversprechende Krebstherapie. Trotzdem weisen Melanomzellen sowohl eine bestehende als auch induzierbare TRAIL-Resistenz auf. In der vorliegenden Arbeit wurde die Überwindung der TRAIL-Resistenz sowohl durch die Multikinaseinhibitoren BMS-345541 und dem Indirubin 8-Rha- β als auch dem pan-RAF-Inhibitor L-779,450 untersucht.

Das Indirubin-Derivat Rha- β ist in der Lage, die Sensitivität von Melanomzellen für die Todesliganden zu erhöhen und die Resistenz für TRAIL und CD95-Agonisten zu überwinden. Indirubin stammt aus der traditionellen chinesischen Medizin und ist als ein potenter Kinaseinhibitor bekannt. Die Untersuchung der apoptotischen Signalwege offenbarte, dass die Behandlung von TRAIL in einer schnellen (innerhalb von 8 h) Herunterregulation der beiden agonistischen TRAIL-Rezeptoren DR4 und DR5 resultiert. Dies ist als eine Art negative Resonanzschleife zu verstehen. Die Behandlung mit Indirubin 8-Rha- β vermittelt die Heraufregulation beider Rezeptoren, sodass die negative Resonanzschleife durch TRAIL kompensiert wurde. Dieses Indirubin-Derivat aktiviert den intrinsischen Apoptosesignalweg, was in dem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und der Freisetzung von Cytochrom C beobachtet werden konnte. Die Antwort der Mitochondrien war mit der Hochregulation von Bax und Bad und der Herunterregulation von Mcl-1 verbunden. Bemerkenswert war, dass das Indirubin in der Kombination mit TRAIL in der Lage war, die Apoptoseresistenz durch die ektopische Bcl-2-Überexpression zu überwinden. Der Tumorsuppressor p53 zeigte sich als Hauptregulator dieser proapoptotischen Änderungen und ist der Transaktivator der proapoptotischen Proteine, welche durch das Indirubin heraufreguliert wurden.

Unterschiedliche Strategien zur Sensitivierung von TRAIL und eine damit verbundene Abhängigkeit von Bax wurden beschrieben, aber allgemeine Mechanismen der TRAIL-Resistenz und der Aktivierung von Bax blieben schlecht verstanden. Die Anwendung eines Melanommodells von TRAIL-sensitiven und resistenten Zelllinien konnte eine effiziente Sensitivierung für TRAIL mittels des Kinaseinhibitors BMS-345541 aufzeigen. Dieser Effekt war vollständig durch einen Bax-Knockout oder eine Bcl-2-Überexpression blockiert, was einer Abhängigkeit von Bax entspricht. Der frühe Verlust des mitochondrialen Membranpotentials, die Freisetzung von Smac und Cytochrom C wiesen deutlich auf die Aktivierung des mitochondrialen Apoptosesignalweges hin. Bemerkenswert war, dass die Behandlung von BMS-345541 alleine in einer frühen Bax-

Aktivierung resultierte, was in den Konformationsänderungen und der Translokation von Bax beobachtet werden konnte. Die synergistischen Effekte resultierten aus der Aktivierung von Bid durch TRAIL, welches Bcl-2 inhibiert und der Aktivierung von Bax durch BMS-345541. Die kritische Rolle von Smac und Bid wurde deutlich durch einen siRNA-vermittelten Knockdown nachgewiesen. Der Weg der Bax-Aktivierung durch BMS-345541 konnte durch die Etablierung einer neuen Nachweismethode für die Bax-Aktivierung untersucht werden. Diese Nachweismethode zeigte eine Reduktion der inaktivierenden Bax-Phosphorylierung an Serin-184, während die aktivierende Bax-Phosphorylierung an Threonin-167 verstärkt war.

Mutiertes BRAF wurde als der kritische Faktor für das kutane Melanom identifiziert. Der Einsatz zur Inhibierung von mutiertem BRAF mittels niedermolekularen Inhibitoren repräsentiert derzeit die wirkungsvollste Therapie gegen das maligne Melanom. Ungeachtet dessen können sich Therapieresistenzen nach der initialen, eindrucksvollen Reaktion gegenüber diesen Substanzen entwickeln, was sich in einer Tumorregression zeigt. Neben dem generellen Verständnis der MAPK-Kaskade bleibt aber das Verständnis zu der funktionellen Aktivität der BRAF-Inhibitoren weitgehend unverstanden. In dieser Arbeit wird ein pan-RAF-Inhibitor, L-779,450, verwendet. Dieser Inhibitor ist in der Lage sowohl in BRAF-mutierten Melanomzellen einen Zellzyklusarrest zu induzieren als auch in diesen Zellen für eine TRAIL-induzierte Apoptose zu sensitivieren. Im Gegensatz dazu zeigten die BRAF-Wildtyp-Zellen kein Ansprechen auf die Behandlung. Die Apoptose war mit der Aktivierung des mitochondrialen Signalweges verbunden. Dies konnte im Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und der Freisetzung proapoptotischer Faktoren (Cytochrom C, SMAC und AIF) gesehen werden. Zusätzlich war später Caspase-9 und -3 aktiviert. Die Apoptoseinduktion durch L-779,450/TRAIL war Bax abhängig und konnte durch die Überexpression von Bcl-2 blockiert werden. L-779,450 allein induziert keine Apoptose, aber resultiert in einer Aktivierung von Bax, wie es mittels der Konformationsänderung von Bax demonstriert werden konnte. Die Induktion der Apoptose kann weiter von der Induktion von Bim abhängig sein. Letztendlich resultierte die Inhibierung von RAF in der Sensitivierung von Melanomzelllinien für Apoptosesignale mittels Bax und Bim.

Die hier identifizierten Kinaseinhibitoren BMS-345541, Indirubin 8-Rha- β and L-779,450, welche für die TRAIL-induzierte Apoptoseinduktion sensitivieren konnten, könnten bei der Behandlung des malignen Melanoms helfen, um die TRAIL-Resistenz zu überwinden und die Wirksamkeit TRAIL-vermittelter Therapieformen zu optimieren.

Abstract

Until today efficient therapies are lacking for metastatic melanoma. The death ligand TRAIL appears as promising in cancer treatment; however, melanoma cells reveal both preexisting and inducible TRAIL resistance. In the present study the mechanisms of TRAIL-induced apoptosis by the multikinase inhibitors BMS-345541 and indirubin 8-Rha- β as well as the pan-RAF inhibitor L-779,450 were investigated.

The indirubin derivative 8-Rha- β is able to enhance melanoma cell sensitivity for death ligands and overcomes resistance to TRAIL and CD95 agonists. Indirubin is known from traditional Chinese medicine and is a potent kinase inhibitor. Unraveling of apoptotic signaling pathways revealed that TRAIL resulted in a quick (within 8 h) downregulation of both agonistic TRAIL receptors DR4 and DR5, in a manner of a negative feed-backloop. Treatment with indirubin, however, mediated upregulation of both receptors, thus compensating this negative feed-backloop by TRAIL. Furthermore, indirubin activated intrinsic apoptosis pathways, seen in loss of mitochondrial membrane potential and release of cytochrome c. The mitochondrial response appeared as related to upregulation of Bax and Bad and to downregulation of Mcl-1. Remarkably, indirubin in combination with TRAIL was also able to overcome apoptosis resistance due to ectopic Bcl-2 overexpression. The tumor suppressor p53 by its ability to transactivate proapoptotic proteins appeared as master regulator of these proapoptotic changes which was upregulated by indirubin.

Different strategies of TRAIL sensitization and a dependency on Bax have been described, but common principles of TRAIL resistance and the way of Bax activation remained poorly understood. Applying a melanoma model of TRAIL-sensitive and resistant cell lines, efficient sensitization for TRAIL is demonstrated for the kinase inhibitor BMS-345541. This effect was completely abrogated by Bax knockout or Bcl-2 overexpression, in accordance with the Bax dependency. Early loss of the mitochondrial membrane potential, release of cytochrome c and Smac clearly indicated an activation of mitochondrial apoptosis pathways. Of note, BMS-345541 alone resulted in early Bax activation, seen by conformational changes and Bax translocation. The synergistic effects resulted from Bid activation in response to TRAIL, which inhibits Bcl-2, and the activation of Bax through BMS-345541. The critical roles of Smac and Bid were clearly proven by siRNA knockdown. The way of Bax activation by BMS-345541 was unraveled by establishing a new assay for Bax activation. This assay showed reduction of the inactivating Bax phosphorylation at serin-184, while the activating Bax phosphorylation at

threonin-167 was enhanced. Thus, modulation of Bax phosphorylation appeared as tightly related to TRAIL sensitivity/resistance in melanoma cells, and therapeutic strategies may be considered.

Mutated BRAF represents a critical oncogene in melanoma, and BRAF inhibitors are presently evaluated in clinical trials. However after initial tumor regression, resistance and tumor relapse are frequently seen. Besides a general understanding of MAPKs, the molecular consequences of BRAF inhibition in melanoma remained largely elusive. Here, we investigated effects of the pan-RAF inhibitor L-779,450, which resulted in cell cycle arrest in BRAF-mutated melanoma cells and in strong enhancement of apoptosis in combination with TRAIL. In contrast, BRAF WT cells were not responsive. Apoptosis coincided with activation of mitochondrial pathways, seen by loss of mitochondrial membrane potential and release of cytochrome c, SMAC and AIF. Subsequently, caspases-9 and -3 were activated. Apoptosis induction by L-779,450/TRAIL was prevented by Bcl-2 overexpression and was dependent on Bax. Activation of Bax by L-779,450 alone was demonstrated by Bax conformational changes. Bax activation may depend on induction of the BH3-only protein Bim. Thus, RAF inhibition resulted in sensitization of melanoma cells for TRAIL via Bax and Bim. These characteristics may be considered when evaluating BRAF inhibitors in melanoma therapy.

This identified specific role of these kinase inhibitors BMS-345541, indirubin 8-Rha- β and L-779,450, which are able to enhance melanoma cell sensitivity for TRAIL could be helpful for treatment of malignant melanoma to overcome the TRAIL-resistance and to optimize the efficiency of recent therapies.

1 Einleitung

1.1 Das Maligne Melanom

1.1.1 Epidemiologie und Progression

Das Auftreten des Melanoms, eines invasiven, malignen Tumors, ist in dem letzten Jahrzehnt weltweit dramatisch angewachsen. Besonders häufig tritt diese Tumorart bei hellem Hauttyp und bei gleichzeitiger hoher Sonnenexposition auf (Balch et al. 2001). Charakteristisch für das maligne Melanom ist hauptsächlich die äußerst hohe Mortalität, wenn das Melanom metastasiert ist. Zusätzlich ist für die Melanomzellen deren Überlebensfähigkeit und Apoptoseresistenz gegenüber Chemotherapeutika kennzeichnend. Diese Faktoren ermöglichen demzufolge das Auftreten von Fernmetastasen auch nach Jahren der Entfernung des Primärtumors (Garbe und Leiter 2009).

Das Plattenepithelkarzinom und das Basalzellkarzinom stellen neben dem malignen Melanom die häufigsten Tumore der Haut dar. Als Ursache der Inzidenz und Mortalität ist das maligne Melanom die aggressivste Form der Hauttumore. Es entsteht durch die maligne Entartung von Melanozyten. Primäre Melanome entstehen aus melanozytären Nävi oder als Neubildungen. In der radialen Wachstumsphase (radial growth phase - RGP) sind die Zellen lokal invasiv, weisen dennoch keine metastasierenden Eigenschaften auf. In der sich anschließenden vertikalen Wachstumsphase (vertical growth phase - VGP) infiltrieren Melanomzellen in Form von Clustern die Dermis und entfalten die metastasierenden Eigenschaften. Fernmetastasen stellen hierbei den letzten Schritt dar (Clark 1991).

Die Bildung eines Melanoms wird durch unterschiedliche Risikofaktoren begünstigt. Hierzu gehören ein heller Hauttyp (Hauttyp I und II), eine hohe Sonnenexposition sowie mehrere starke Sonnenbrände in der Kindheit, eine hohe Anzahl von Nävi, familiäre Disposition und höheres Lebensalter.

1.1.2 Klinische Charakteristika des frühen Melanoms und Arten des Melanoms

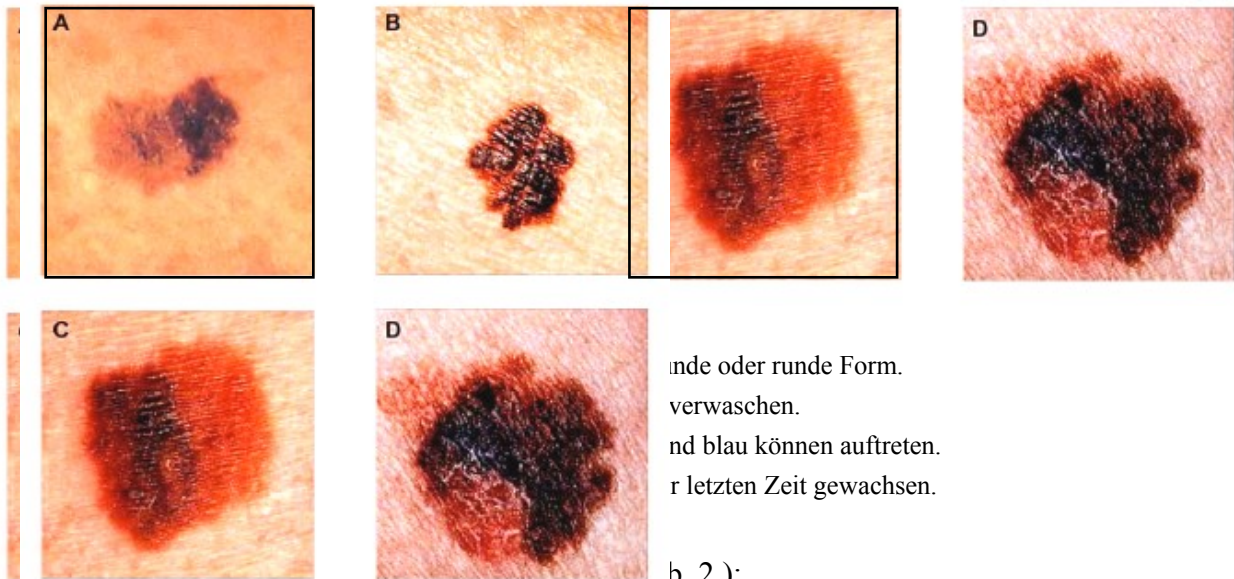
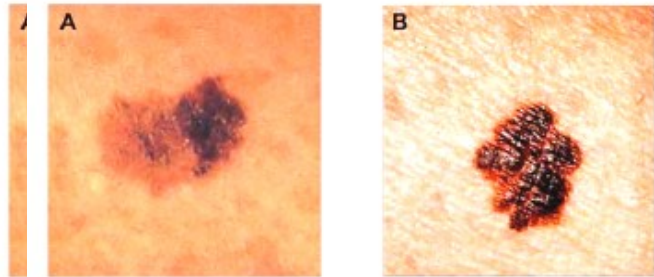
Mittels der ABCD-Kriterien kann das Maligne Melanom klinisch diagnostiziert werden:

A) Asymmetry - Asymmetrie: Das Melanom lässt sich nicht durch eine Spiegelebene in zwei gleiche Hälften teilen (Abb. 1A).

B) Border irregularity - Begrenzung: Die Ränder des Melanoms sind unregelmäßig und gezackt (Abb. 1B).

C) Color variability - Color: Das Melanom braune, schwarze, bläuliche oder auch ung

D) Diameter - Durchmesser: Der Durchmesser ist kleiner, aber hat sich in kurzer Zeit stark



1. Superfiziell Spreitendes Melanom (SSM)

Dieses stellt die häufigste Form des malignen Melanoms dar. Die Läsion ist zu Beginn flach und wächst horizontal. In den späteren Phasen ist die Oberfläche inhomogen und die Begrenzung unregelmäßig.

2. Noduläres Melanom (NM)

Diese Form des Melanoms ist durch ein frühes vertikales Wachstum mit schneller Invasion in die Dermis gekennzeichnet. Charakteristisch für diesen Melanomtyp ist blauschwarz und knotig oder halbkugelig mit meist scharf begrenzten Rändern.

3. Lentigo malignes Melanom (LMM)

Diese Form ist durch ein langsames Wachstum charakterisiert und metastasiert infolgedessen nur in seltenen Fällen. Kennzeichnend ist eine große, bräunliche Läsion.

4. Akrolentiginöses Melanom (ALM)

Diese Form tritt an Händen, Füßen oder ebenfalls unter den Nägeln auf und zeigt vielfach Ulzerationen. Bei dunkelhäutigen Menschen ist diese Form häufig zu finden.

5. Andere seltene Melanomformen

Hierzu zählen das Uvea-Melanom, welches aus den Melanozyten der Aderhaut entsteht, und das Schleimhaut-Melanom, welches im Mund, im Genitalbereich, dem Respirations- oder dem Gastrointestinaltrakt auftreten kann.

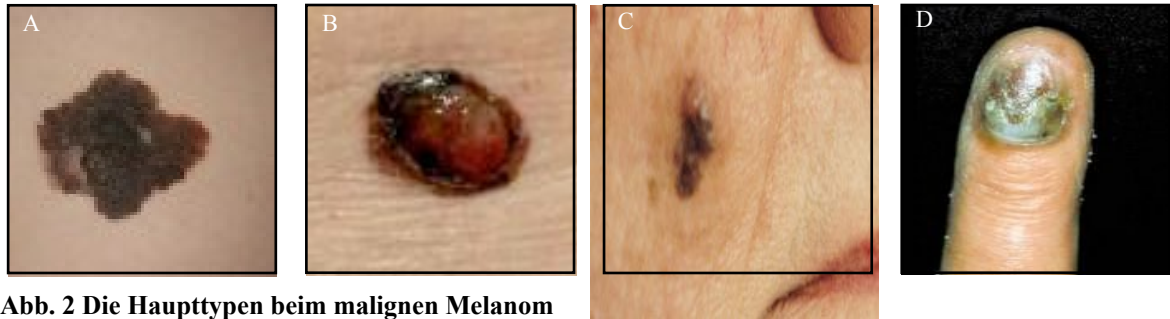


Abb. 2 Die Haupttypen beim malignen Melanom

- A. Superfiziell spreitendes Melanom (SSM)
- B. Noduläres Melanom (NM)
- C. Lentigo malignes Melanom (LMM)
- D. Akrolentiginöses Melanom (ALM)

1.1.3 Einteilung der Stadien und Prognose

Die wichtigsten prognostischen Indikatoren für eine mögliche Metastasierung beim Melanom sind die Dicke und die Invasionstiefe des Primärtumors in die Dermis. Folgende Parameter zieht man vorwiegend zur Tumorcharakterisierung bezüglich Tumordicke und Invasionslevel heran:

1. Tumordicke nach Breslow. Hierzu wird die Tumordicke von der Granularzellschicht der Epidermis bis zu der tiefsten Stelle des Tumors gemessen (Breslow 1978).
2. Invasionslevel nach Clark. Hierzu wird die Eindringtiefe des Tumors in die verschiedenen Schichten der Haut bestimmt (Clark et al. 1984).

- Level I: In situ: Der Tumor befindet sich innerhalb der Epidermis.
- Level II: Invasion ins Stratum papillare der Dermis
- Level III: Invasion ins Stratum reticulare der Dermis
- Level IV: Stratum papillare und Stratum reticulare voll erfasst
- Level V: Invasion in das subkutane Fettgewebe

Die Stadieneinteilung richtet sich nach der Dicke des Primärtumors, nach regionären Lymphknotenmetastasen und nach Fernmetastasen. Im Allgemeinen gilt: Je dicker der Tumor und je mehr Lymphknotenmetastasen oder Fernmetastasen, desto höher wird das Stadium eingestuft. Die 5-Jahres-Überlebensrate ist in ausschlaggebendem Maße vom Stadium abhängig. Während die 5-Jahres-Überlebensrate bei einem kleinen Primärtumor

(< 1,0 mm) bei 95 % liegt, reduziert sie sich bei Fernmetastasen bis auf 18 % (nach AJCC 2002 Melanoma Staging).

1.1.4 Behandlung des malignen Melanoms

Die wichtigste Maßnahme in der Therapie ist die Diagnose des malignen Melanoms in einem frühen Stadium. Durch die komplette operative Entfernung des Primärtumors im Stadium I ergibt sich daher eine Überlebensrate von über 90%. Das fortgeschrittene Melanom kann in verschiedene Organe wie Lunge, Leber, Knochen oder Gehirn metastasieren, was die Möglichkeiten einer operativen Entfernung stark einschränkt (Balch et al. 2001). Die schlechte Prognose für die Überlebensrate und die geringe Ansprechrate auf konventionelle Chemotherapeutika beim metastasierten Melanom ruhen auf einer Therapie-Resistenz, welche in Verbindung zu Defekten in der proapoptotischen Signalkaskade stehen. Die Chemotherapieresistenz bezüglich der Apoptose wird mit drei verschiedenen molekularen Veränderungen in Zusammenhang gebracht:

- i) Aktivierung von antiapoptotischen Faktoren (Soengas und Lowe 2003)
- ii) Inaktivierung von proapoptotischen Faktoren (Soengas und Lowe 2003)
- iii) Reaktivierung von Überlebenssignalen (Eberle et al. 2007a).

Verschiedene Chemotherapeutika sowie Interferon-alpha (IFN- α) und Interleukin-2 (IL-2) werden bei Patienten mit fortgeschrittenem Melanom angewendet. Leider zeigten sich mit diesen Behandlungsmethoden nur relativ geringe Ansprechraten (Keilholz und Gore 2002). Erst in den letzten Jahren gab es positive Ergebnisse mit spezifischen Therapieansätzen, die deutliche Ansprechraten aufweisen (Davar et al. 2012).

Die dennoch hohen Sterberaten beim metastasierten Melanom und die geringe Effektivität herkömmlicher Chemotherapeutika verdeutlichen die Notwendigkeit der Entwicklung von neuen, wirksamen Substanzen und Strategien, um die hohe Therapieresistenz zu überwinden.

Eine Therapiemöglichkeit gegen das maligne Melanom stellt der adoptive Transfer von T-Zellen dar. Hierbei werden polyklonale T-Zellen, Tumordinfiltrierende Lymphozyten, aus Melanom-Tumorgewebe entnommen und dem Patienten nach in vitro-Stimulation und Expansion mit hohen Dosen an IL-2 wiedergegeben. Die adoptive Tumormimmuntherapie gegen das Melanom zeigte in Studien positive Ergebnisse (Besser et al. 2010; Rosenberg et al. 1988; Rosenberg et al. 2011). Die Identifizierung von tumorassoziierten Antigenen wie Peptiden aus der Familie der Cancer-Testis-Antigene (z.B. NY-ESO-1) oder der

Melanozytendifferenzierungsantigene (z.B. Melan-A) beim malignen Melanom hat zur Entwicklung verschiedener Strategien zur Generierung antigenspezifischer T-Zellen geführt, die im Rahmen einer adoptiven Immuntherapie gezielt eingesetzt werden können. In klinischen Studien wurde die Wirksamkeit von patienteneigenen T-Lymphozyten, die einen gentechnisch veränderten T-Zell-Rezeptor exprimieren, überprüft. Dieser Rezeptor war so modifiziert, dass er das Antigen NY-ESO-1 erkennt. Diese Studie wies ein klinisch objektives Ansprechen (47%) bei Patienten mit malignem Melanom auf (Restifo et al. 2012; Robbins et al. 2011). Die Verwendung der adoptiven Tumorimmuntherapie stellt neben dem Einsatz von Kinaseinhibitoren (Abschnitt 1.6.2) einen weiter zu verfolgenden Ansatz gegen das maligne Melanom dar.

1.2 Der programmierte Zelltod - Apoptose

Der Begriff Apoptose, der programmierte Zelltod, hat seinen Ursprung im Griechischen. Das Wort steht ursprünglich für das Abfallen der Blätter der Bäume. In der Biologie wird der Begriff der Apoptose gebraucht, um das Absterben von Zellen nach einem definierten Programm zu beschreiben. Daher wird Apoptose auch als programmierter Zelltod bezeichnet (Kerr 1995; Lockshin und Williams 1964). Die Apoptose ist ein in der Evolution hoch konservierter Mechanismus mit essentieller Bedeutung, die sowohl der Aufrechterhaltung der Zellhomöostase dient, als auch für die Entwicklung von Immunzellen von Bedeutung ist (Brenner et al. 2008).

Charakteristisch für die Apoptose sind das Schrumpfen der Zellen, Chromatin-Kondensation und DNA-Fragmentierung, wobei die Integrität der Membran erhalten bleibt. Während der Apoptose schnüren sich exozytotische Membranvesikel von der Plasmamembran ab, welche Fragmente der Zelle enthalten. Diese werden als apoptotische Körperchen (apoptotic bodies) bezeichnet. Die Zellreste werden durch Makrophagen bzw. Nachbarzellen aufgenommen, wobei die zytosolischen Bestandteile nicht in den extrazellulären Raum austreten können. Dieser Prozess wird als Phagozytose bezeichnet (Harada und Grant 2003; Hengartner 2000; Tait und Green 2010). Die Apoptose ist ein aktiver, ATP-abhängiger, sowie strikt regulierter biochemischer Prozess. Jede Zelle des menschlichen Körpers verfügt über die Möglichkeit, Apoptosesignalwege zu aktivieren und sich so aus dem Zellverbund zu entfernen (altruistischer Zelltod).

Bei verschiedenen Erkrankungen spielt die Dysregulation in Apoptosesignalwegen eine bedeutende Rolle. Beispielsweise sind Veränderungen, welche zu einer verstärkten Apoptose führen, u.a. bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer oder

Morbus Parkinson beschrieben. Im Gegensatz dazu kann ein Mangel an Apoptose beispielsweise in der Entwicklung von Lymphozyten, zu Autoimmunerkrankungen führen (Goldin und Landgren 2009). Zusätzlich ist der Zusammenhang zwischen der Suppression von Apoptosesignalwegen sowie der Entstehung und der malignen Transformation von Zellen eindeutig belegt (Vermeulen et al. 2005). Diese Hemmung kann einerseits durch inaktivierende Mutationen proapoptotischer Gene andererseits auch durch die Überexpression antiapoptotischer Faktoren geschehen. Diese veränderten Zellen entziehen sich sowohl der Selbstkontrolle als auch der Kontrolle durch das Immunsystem (Igney und Krammer 2002; Kim et al. 2005). Eine solche Apoptosedefizienz kann in diesen Fällen von grundlegender Bedeutung bei der Entstehung von Resistenzen gegenüber Zytostatika sowie immuntherapeutischen Ansätzen sein (Eberle et al. 2007a; Fulda 2009).

1.2.1 Nekrose im Vergleich zur Apoptose

Ein weiterer Zelltodmechanismus neben der Apoptose ist die Nekrose. Im Unterschied zur Apoptose führt die Nekrose in der Regel zu umfassenden Zellschäden, bei denen die Membranintegrität zerstört wird. Es kommt zum Anschwellen und schließlich zum Platzen der Zellen (Abb. 3). Im Gegensatz zur Apoptose ist die Nekrose kein energieabhängiger Prozess. Dabei kann es zur Nekrose nach mechanischer Verletzung, Unterversorgung mit Blut (Ischämie) oder Sauerstoff (Hypoxie), oder Bakterieninfektion der Zelle kommen (Leist und Jaattela 2001). Da der nekrotische Zelltod nicht energieabhängig ist, kann es auch zur Nekrose kommen, wenn eine Apoptoseinduktion ohne ausreichende Energieversorgung besteht (Fink und Cookson 2005).

Obwohl die Nekrose als Unfalltod von Zellen dargestellt wird, deuten neuere Ergebnisse darauf hin, dass auch in diesem Fall spezifische Signalwege beteiligt sein können. Da es hierbei zu Überschneidungen von Apoptosesignalwegen kommen kann, kam es zur Prägung des Begriffes Nekroptose (Degterev und Yuan 2008; Vandenabeele et al. 2010).

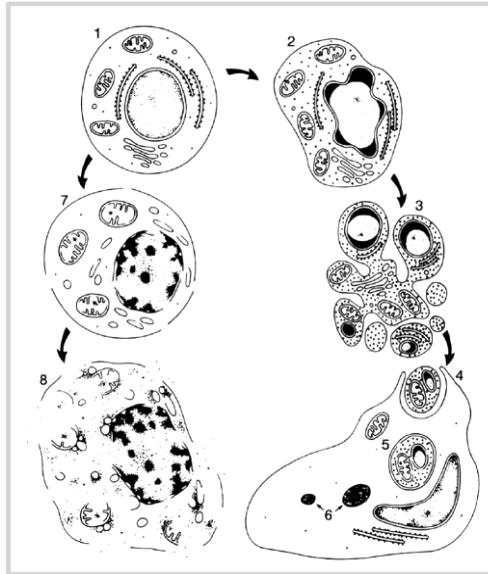


Abb. 3 Vergleich zwischen einer apoptotischen (rechts) und nekrotischen (links) Zelle.

Im Zuge der Apoptose zeigen normale Zellen (1) eine Kondensation des Chromatins (2), eine Zellschrumpfung sowie die Abschnürung von apoptotischen Körperchen (3) und letzten Endes die Aufnahme durch Nachbarzellen (4). Im Unterschied dazu ist die Nekrose durch ein Anschwellen der Zellen und einem Aufbrechen der Zellmembran (7) und letztendlich einem Auslaufen der Zelle (8) und der Induktion von Inflammation charakterisiert (Kerr 1995).

1.2.2 Signalwege der Apoptose

Unterschiedliche Signalwege können abhängig vom proapoptotischen Reiz auf eine Zelle aktiviert werden, die im Allgemeinen in zwei verschiedene Apoptosewege münden. Bei den Signalwegen der Apoptose unterscheidet man zwischen dem extrinsischen Signalweg, der von Todesrezeptoren wie $\text{TNF-}\alpha$ (Tumor-Nekrose-Faktor-alpha), TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) oder CD95 (Cluster of Differentiation 95) ausgeht, und dem intrinsischen Signalweg. Dieser Prozess bei dem Cytochrom C aus den Mitochondrien freigesetzt wird, wird maßgeblich durch p53 induziert (Fulda und Debatin 2006; Tait und Green 2010). Beide Signalwege sind über das Bcl-2-Protein Bid (BH3-interacting domain death agonist) miteinander verbunden und können sich so gegenseitig beeinflussen (Youle und Strasser 2008).

Der intrinsische und der extrinsische Signalweg enden letztendlich mit der Aktivierung von Proteasen und der Spaltung von Todessubstraten, was schließlich zum Absterben der Zelle führt (Fischer et al. 2003; Riedl und Shi 2004) (Abb.4).

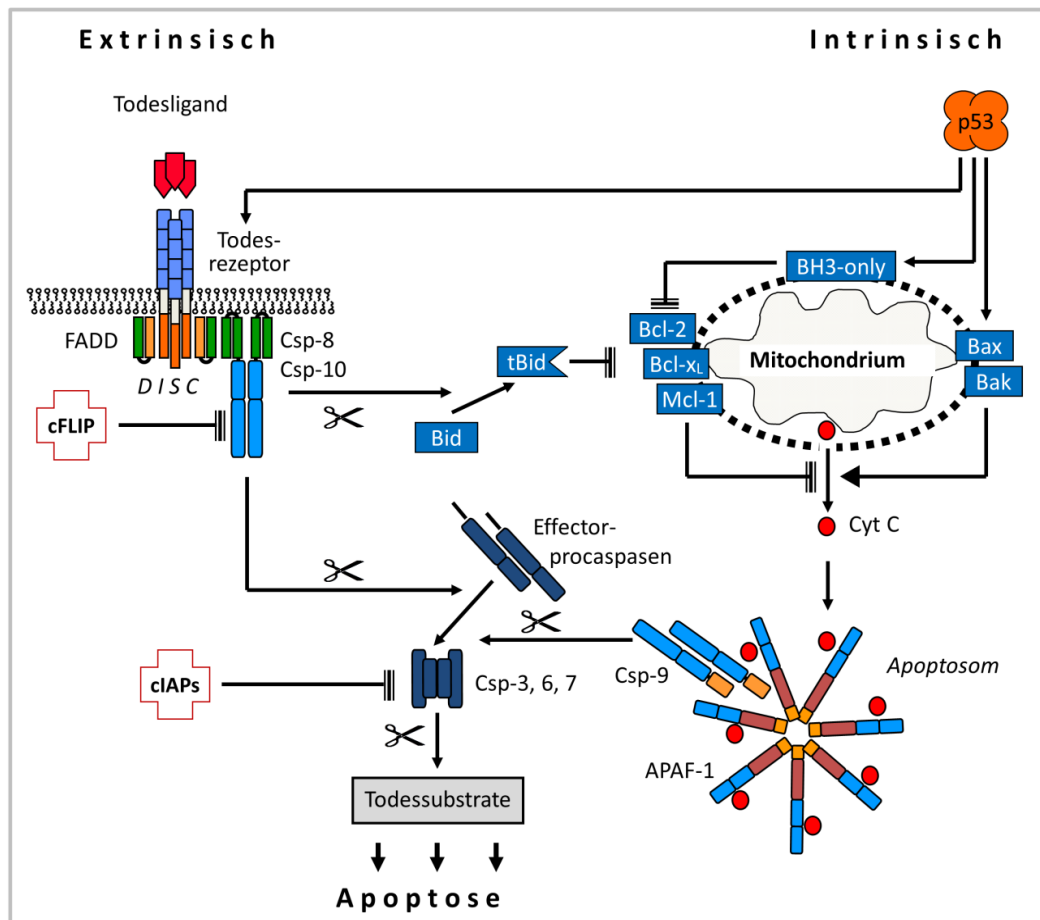


Abb. 4 Signalwege der Apoptose

Gezeigt sind der extrinsische und der intrinsische Apoptosesignalweg. Die Spaltung und folglich die Aktivierung von Caspasen ist mittels (✂) gekennzeichnet. (Eberle et al. 2007b).

1.2.2.1 Der extrinsische Signalweg

Der extrinsische Signalweg wird durch die Bindung von Todesliganden wie CD95L, TRAIL oder TNF- α an die entsprechenden Todesrezeptoren (CD95, TRAIL-R1, -R2 oder TNF-R1), die zur TNF-Rezeptor-Superfamilie gehören, induziert. Dies kann zur Aktivierung der Caspasensignalkaskade führen (Krammer et al. 2007; Lavrik et al. 2005; Wang und El Deiry 2003). Neben der Aktivierung der Caspasensignalkaskade kann es auch zu der Aktivierung von NF- κ B-Signalwegen durch die Anlagerung von anderen Adapterproteinen an den zytoplasmatischen Anteil der Todesrezeptoren kommen (Di Pietro und Zauli 2004; Nicotera et al. 2007). In Folge der Bindung von Todesliganden an ihre Rezeptoren kommt es zu einer Oligomerisierung der Todesrezeptoren und am zytoplasmatischen Teil der Todesrezeptoren zur Bildung des proapoptotischen Multiproteinkomplexes DISC (Death inducing signalling complex), wobei die Initiatorcaspasen -8 und -10 aktiviert werden (Krammer et al. 2007). Die Formierung des

DISC geschieht autokatalytisch mittels der intrazellulären Bindung von Procaspase-8 oder 10 über das Adapterprotein FADD (Fas-associated death domain protein) mit der zytoplasmatischen Todesdomäne des Todesrezeptors. FADD vermittelt somit die Bindung zu den Todesrezeptoren (Scott et al. 2009). Als Folge der Bildung des DISC kommt es zur Aktivierung der Initiatorprocaspasen-8 oder -10. Die aktivierten Initiatorcaspasen können entweder direkt zur Aktivierung der Effektorcaspase-3 führen (Typ I-Zellen, z.B. Lymphozyten), welche letztendlich über die Aktivierung von Effektorcaspasen zur Spaltung von Todessubstraten (z. B. ICAD oder PARP) sowie zur Fragmentierung der DNS führt; oder das Signal wird durch die Spaltung von Bid zu tBid (truncated Bid) an der Mitochondrienmembran amplifiziert (Typ II-Zellen, z.B. Melanozyten) (Fischer et al. 2003; Li et al. 1998; Luo et al. 1998).

1.2.2.2 Der intrinsische Signalweg

Bei dem intrinsischen Apoptosesignalweg sind die Mitochondrien von zentraler Bedeutung. Die Mitochondrien sind somit nicht nur für die Zelle als Energielieferant wichtig, sondern auch bei der Apoptose. Die Aktivierung dieses Apoptosesignalweges erfolgt durch intrazelluläre Signale wie Zell- oder DNS-Schäden, Behandlung mit Chemotherapeutika oder durch Interaktion mit dem Todesrezeptor-regulierten (extrinsischen) Signalweg (Tait und Green 2010). Hierbei kommt es zur Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran (MOMP, engl.: mitochondrial outer membrane permeabilisation) und zu einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\psi_m$ (nähere Erläuterung Abschnitt 1.2.3). Die Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie regulieren die Permeabilität und folglich die Aktivierung des intrinsischen Apoptosesignalweges (Green und Kroemer 2004). Die Permeabilisierung führt zur Freisetzung von proapoptotischen, mitochondrialen Faktoren wie Cytochrom C. Seinerseits bindet dieses an den monomeren Apoptose-aktivierenden Faktor-1 Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor-1). Als Folge oligomerisiert dieser und führt zusammen mit Caspase-9 zur Bildung des Apoptosoms. Die Ausbildung des Apoptosoms führt zur Aktivierung der Effektorcaspasen, wie Caspase-3, -6 und -7 (Chipuk et al. 2010; Riedl und Shi 2004). Im Verlauf der Aktivierung des intrinsischen Signalweges stellt die Verminderung des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\psi_m$ ein reversibles Ereignis dar. Die Freisetzung von Cytochrom C gilt aufgrund der Porenbildung als irreversibler Schritt (Tait und Green 2010).

Ein weiterer proapoptotischer Faktor, der aus den Mitochondrien freigesetzt wird, ist Smac (Second mitochondrial activator of caspases). Dieser Faktor beschleunigt die Caspase-abhängige Apoptose, indem sie die Aktivität der cIAPs (cellular inhibitor of apoptosis), physiologische Caspaseinhibitoren, blockieren (Fulda und Vucic 2012). Andere proapoptotische Faktoren, die aus den Mitochondrien freigesetzt werden können, sind beispielsweise Endonuklease G und AIF (Apoptosis inducing factor). Diese werden als Ursache für Caspase-unabhängige Apoptose diskutiert. Sie sollen in der Lage sein, in den Nukleus zu translozieren und dort die DNS zu fragmentieren. Generell ist der intrinsische, mitochondriale Apoptosesignalweg auch für Therapiestrategien sowie für die Apoptoseinduktion durch intrazelluläre Signale von großer Bedeutung (Abb.5) (Gogvadze et al. 2009; Gupta et al. 2009).

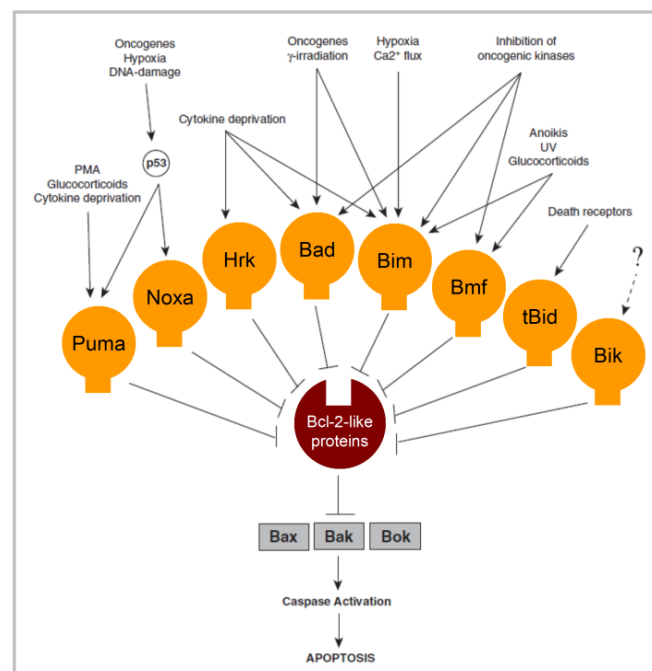


Abb. 5 Aktivierung des mitochondrialen Signalweges durch pro- und antiapoptotische Bcl-2-Proteine. Erläuterungen siehe Abschnitt 1.2.2.2 (Kelly und Strasser 2011).

1.2.3 Apoptoseregulation durch die Bcl-2-Proteinfamilie

Nach der Erstbeschreibung von Bcl-2 (B-cell lymphoma-2) von Tsujimoto *et al* 1984 (Tsujimoto et al. 1984) konnten eine Anzahl von Proteinen auf Grundlage von strukturell ähnlichen Bereichen, den BH (Bcl-2 homology)-Domänen und ihrer Wechselwirkung mit Bcl-2 identifiziert und klassifiziert werden. Gemeinsam bilden sie die Bcl-2-Proteinfamilie. Proteine der Bcl-2-Familie weisen bis zu vier konservierte BH-Domänen (BH1-BH4) auf. Über diese Domänen können die Protein-Protein-Interaktionen stattfinden

(Chipuk et al. 2010). Im Allgemeinen kann die Bcl-2-Proteinfamilie in zwei Gruppen gegliedert werden:

- 1) antiapoptotische Bcl-2-Proteine wie Bcl-2, Bcl-x_L, Mcl-1 (myeloid cell leukemia sequence 1) und A1/Bfl-1 und
- 2) proapoptotische Bcl-2-Proteine.

Die proapoptotische Gruppe lässt sich auch in eine BH-Multidomänengruppe mit Bax (Bcl-2 associated X protein), Bak (Bcl-2 homologous antagonist killer), Bcl-x_S (Bcl-2-like 1 short) und Bcl-x_{AK} (Bcl-2-like 1 atypical killer) sowie in eine BH-3-only-Gruppe mit Bid, Nbk/Bik (Natural born killer/Bcl-2-interakting killer), Bad (Bcl-2 antagonist of cell death), Noxa und Puma (p53 upregulated modulator of apoptosis) aufgliedern (Abb.6) (Hossini und Eberle 2008).

Eine Interaktion von pro- und antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen resultiert über die Bindung der exponierten BH3-Domäne der proapoptotischen Bcl-2-Proteine an eine als hydrophobe Tasche bezeichnete Struktur. Diese formt sich aus einer Anzahl von BH-Domänen der antiapoptotischen Bcl-2-Proteine. Die BH4-Domäne kann zu einer Stabilisierung dieser Wechselwirkung beitragen (Hossini und Eberle 2008). Eine derartige Bindung führt zur Blockierung der proapoptotischen Funktion der entsprechenden Bcl-2-Proteine. Eine Verstärkung der Wirkung ist durch eine vergleichbare Interaktion zwischen proapoptotischen Bcl-2-Proteinen zu beobachten (Daniel et al. 2003).

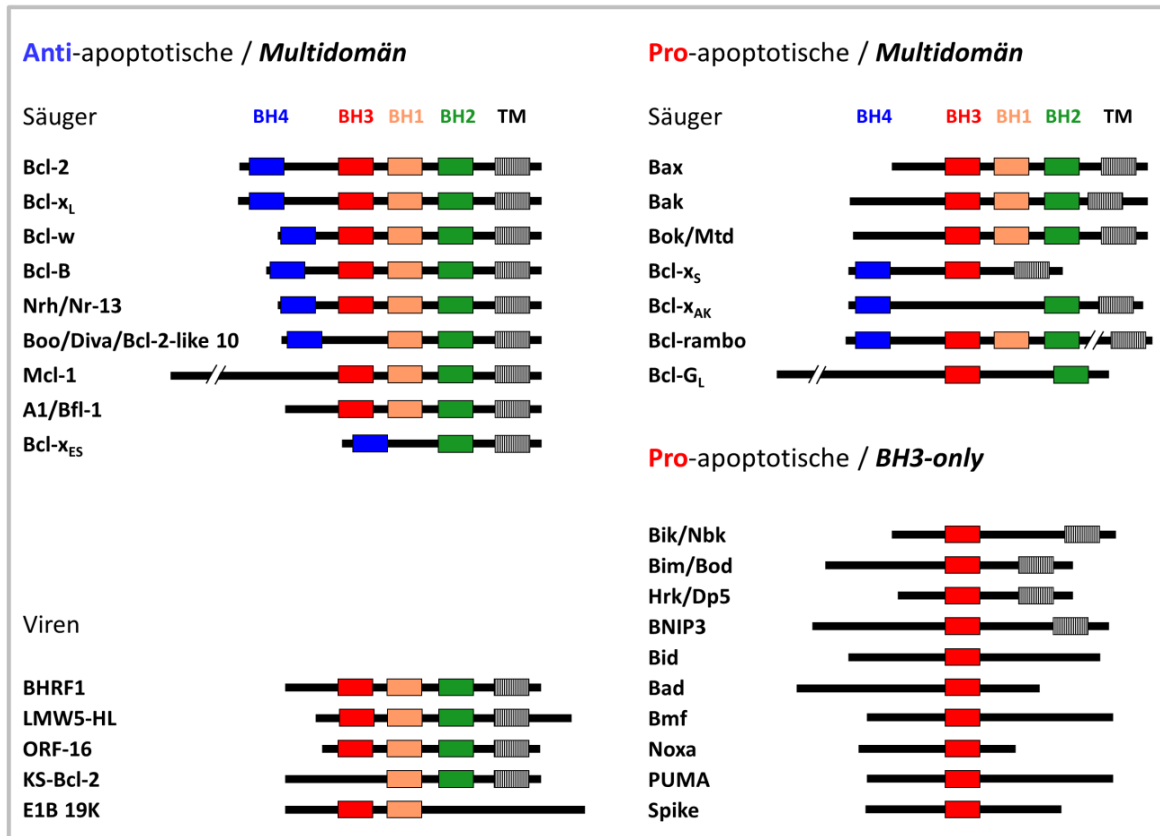


Abb. 6 Schematische Darstellung der Struktur von anti- und proapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-Proteinfamilie (Eberle et al. 2007b).

Dargestellt sind die BH-Domänen (BH1-4) sowie die Transmembrandomäne (TM) (Eberle et al. 2007b).

Die Bcl-2-Proteine befinden sich in räumlicher Nähe zur äußeren Mitochondrienmembran. Die antiapoptotischen Bcl-2-Proteine tragen hierbei zur Stabilisierung der Mitochondrienmembran bei. Die proapoptotischen Bcl-2-Proteine können hingegen zur Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran und zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\psi_m$ beitragen (Kim et al. 2006b). Die proapoptotischen Bcl-2-Proteine wie Bax und Bak bilden bei diesem Prozess mittels Oligomerisierung und allosterische Konformationsänderungen Poren in der äußeren Mitochondrienmembran. Dabei unterliegt die Oligomerisierung von Bax oder Bak einer negativen Kontrolle, die durch die Interaktion (Heterodimerisierung) mit den antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen wie Bcl-x_L, Bcl-2 oder Mcl-1 vermittelt wird (Green und Kroemer 2004). Die Funktion von Bax kann auch durch Phosphorylierung beeinflusst werden. Hierzu ist eine u.a. deaktivierende Phosphorylierung von Bax an Serin-184 (Gardai et al. 2004; Renault und Manon 2011; Wang et al. 2010a) und aktivierende Phosphorylierung von Bax an Threonin-167 (Kim et al. 2006a) beschrieben. Die

Lokalisation der Bcl-2-Proteine ist im Allgemeinen an der äußeren Mitochondrienmembran. Inaktiviert liegen sie jedoch im Zytoplasma vor. Der Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\psi_m$) und die Freisetzung von mitochondrialen Faktoren wie Cytochrom C, AIF, Endonuklease G, Smac/DIABLO und HtrA2/Omi (Chipuk et al. 2010; Chipuk und Green 2008) sind das Ergebnis aus proapoptotischen Stimuli und dem daraus resultierenden Übergewicht an eingelagerten proapoptotischen Bcl-2-Proteinen und somit der Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran (MOMP). Diese Faktoren führen im Zytoplasma zur Aktivierung von Caspase-abhängigen Apoptosesignalwegen, können aber auch zum Teil unabhängig von Caspasen zu DNS-Fragmentierung führen.

1.3 Caspasen

1.3.1 Rolle der Caspasen in der Apoptose

Caspasen sind eine Gruppe von Proteasen, die in der Apoptoseregulation von elementarer Bedeutung sind (Tab. 1). Caspasen sind Cystein-abhängige Aspartat-spaltende Proteasen, die als inaktive Zymogene synthetisiert werden und aus einer großen und einer kleinen Untereinheit, sowie einer N-terminalen Prodomäne bestehen. Die Aktivierung der Caspasen erfolgt entweder autokatalytisch oder durch andere Caspasen. Im ersten Schritt wird die Prodomäne abgetrennt und anschließend die große von der kleinen Untereinheit gespalten. Aktive Caspasen formen jeweils ein Heterotetramer aus zwei identisch großen Untereinheiten von ca. 20 kDa und zwei identisch kleinen Untereinheiten von ca. 10 kDa (Riedl und Shi 2004).

Beim Menschen sind gegenwärtig 12 verschiedene Caspasen bekannt, die aufgrund ihrer Substratspezifität in drei Hauptgruppen eingeteilt werden (Tab.1).

Caspase	8, 10, 9, 2	3, 6, 7	1, 4, 5, 12 _L	14
Funktion	Apoptose	Apoptose	Inflammation	Keratinocyten-differenzierung
Initiatorcaspasen		Effektorcaspasen		

Tab. 1 Funktion der Caspasen in humanen Zellen (Taylor et al. 2008).

Die erste Gruppe bilden die Effektorcaspasen, die zweite Gruppe die Initiatorcaspasen und die dritte Gruppe ist an Entzündungsprozessen beteiligt (Fuentes-Prior und Salvesen 2004).

Eine Sonderstellung nimmt Caspase-14 ein, da diese mit der Differenzierung von Keratinozyten in Verbindung gebracht wird (Eckhart et al. 2000). Für die Apoptose sind nur die Initiatorcaspasen und die Effektorcaspasen von Bedeutung.

Zu den Initiatorcaspasen gehören die Caspasen-2, -8, -9 und -10. Sie besitzen eine große Prodomäne, die Aminosäuresequenzen für die Selbstassoziation und für die Bindung an aktivierende Adaptoren beinhalten (Stennicke und Salvesen 2000). Procaspase-9 bildet mit Apaf-1 und Cytochrom C das Apoptosom. Procaspase-8 bindet mit FADD und CD95 am DISC und Procaspase-2, die nach genotoxischem Stress durch p53 aktiviert werden kann, ist an die Adapterproteine PIDD (p53-induced protein with death domain) und RAIDD (RIP-associated ICH-1/CED-3-homologous protein with Death Domain) gebunden (Tinel und Tschopp 2004) (Abb.7).

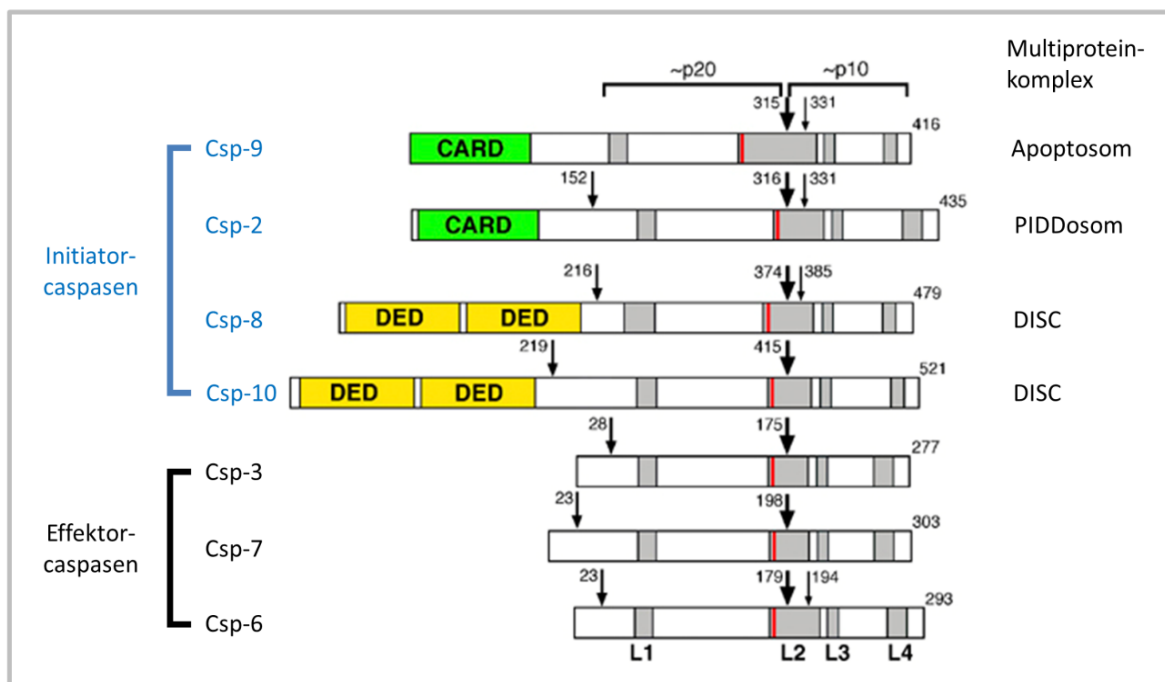


Abb. 7 Caspasenaufbau.

Position der ersten Spaltstelle, zwischen der großen (p20) und der kleinen (p10) Untereinheit, ist durch einen dicken Pfeil, die weiteren Schnittstellen durch weitere Pfeile dargestellt. Die Prodomäne der Initiatorcaspasen enthält DED (death effector domain) oder CARD (caspase recruitment domain)-Domänen. Eingezeichnet sind die Oberflächen-Loops (L1-4) sowie in Rot die katalytisch aktiven Cysteinreste (Bao und Shi 2007).

Zu den Effektorcaspasen gehören die Caspasen-3, -6 und -7. Die aktivierten Initiatorcaspasen sind in der Lage, die kurze Prodomäne der Effektorcaspasen abzuspalten und somit diese zu aktivieren (Abb.8). Nach der Spaltung kontrollieren die Effektorcaspasen eine Vielzahl von Todessubstraten, die für die Initiation der Apoptose verantwortlich sind (Degterev und Yuan 2008). Ein gut beschriebenes Todessubstrat stellt

die Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) dar. PARP ist ein nukleares Protein, das an der DNS-Reparatur beteiligt ist und direkt über Caspase-3 gespalten und somit inaktiviert werden kann (Vermeulen et al. 2005).

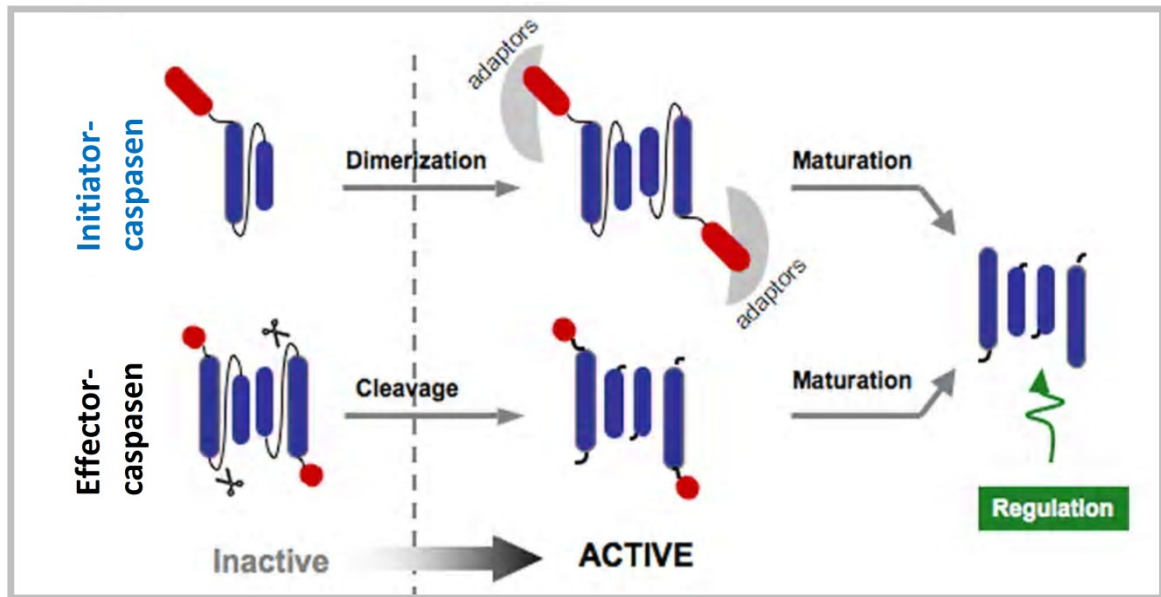


Abb. 8 Prozessierung von Initiator- und Effektorcaspasen (Pop und Salvesen 2009).

1.3.2 Caspaseinhibitoren

Es sind drei Ebenen der Regulation von aktiven Caspasen beschrieben:

- 1) die direkte Caspaseninhibition
- 2) die Caspasendegradation und
- 3) die Caspaseninhibition durch Decoy-Inhibitoren.

Eine direkte Caspaseninhibition kann beispielsweise durch die Bindung von nicht spaltbaren Substraten an die katalytisch aktiven Stellen erfolgen. Hierfür sind die viralen Proteine CrmA (cytokine response modifier A) oder p35 beispielhaft (Stennicke et al. 2002). Diese stellen wahrscheinlich vielmehr unspezifische Caspaseninhibition dar. Ein spezifischer Ansatz der direkten Caspaseninhibition wird durch die cIAP -Proteinfamilie repräsentiert. Das charakterisierende Merkmal der cIAPs sind die BIR- (baculovirus IAP repeat) Domänen. Diese Zinkbindungsstellen enthalten 70 Aminosäuren, die für die Proteinwechselwirkungen bedeutsam sind (Birnbaum et al. 1994; Hinds et al. 1999). Generell sind zwei Gruppen von BIR-Domänen zu unterscheiden, Typ I (BIR 1) und Typ II (BIR 2 und BIR 3), die jeweils spezifische Bindungseigenschaften besitzen (Abb. 9). Die Unterscheidung von Typ I und Typ II BIR-Domäne ist ferner mit der Ab- bzw.

Anwesenheit einer sogenannten „deep-peptide binding groove“ in Zusammenhang zu bringen (Lu et al. 2007; Rothe et al. 1995; Uren et al. 1996). Die in Säugetierzellen vorkommenden IAPs, XIAP, cIAP-1, cIAP-2, NIAP, hILP-2, Livin, Bruce oder Survivin, verfügen bis zu drei dieser Domänen im N-terminalen Bereich. Abgesehen von diesen Domänen kann sich C-terminal zusätzlich eine RING-Finger-Domäne, die eine E3-Ubiquitinligase-Aktivität besitzt (Yang und Li 2000) bzw. eine UBA-Domäne befinden, die für die Interaktion mit ubiquitinierten Proteinen erforderlich ist (Birnbaum et al. 1994; Gyrd-Hansen et al. 2008).

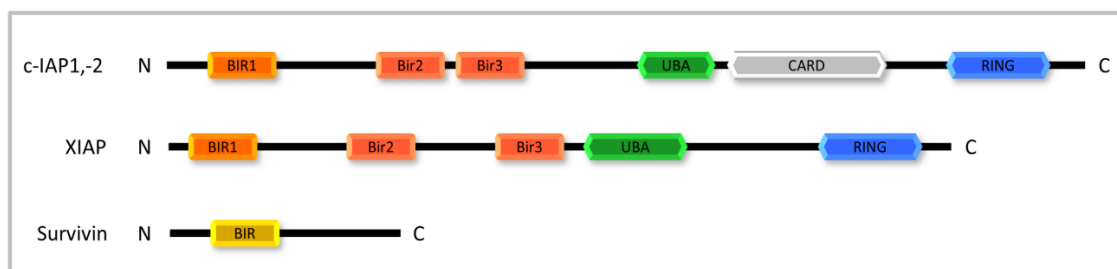


Abb. 9 Schematische Darstellung verschiedener Mitglieder der IAP-Proteinfamilie

(Altieri 2010; Birnbaum et al. 1994; Gyrd-Hansen und Meier 2010).

XIAP (X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein) besitzt die Fähigkeit, durch direkte Bindung Effektorcaspasen sowie die Initiatorcaspase-9 zu blockieren (Bratton und Salvesen 2010). Im Allgemeinen werden IAPs mit der Regulation der Caspasen-abhängigen Apoptose in Verbindung gebracht. Sie spielen jedoch ebenfalls in verschiedenen anderen Signalwegen eine bedeutsame Rolle, zum Beispiel in der Ubiquitin-abhängigen Regulation der Aktivierung von NF- κ B (Galban et al. 2008; Galban und Duckett 2010). In der Metastasierung, der MAPK-(Mitogen-activated protein kinase) Signalgebung, der Zellteilung sowie der Mitose sollen die IAPs bedeutsam sein (Dogan et al. 2008; Mehrotra et al. 2010). Die Expression von Mitgliedern der IAP-Proteinfamilie sind in verschiedenen Tumoren mit Chemoresistenz, Progression sowie einer verschlechterten Prognose verbunden (LaCasse et al. 2008). Diese Erkenntnisse führten zu der Entwicklung von sogenannten Smac-Mimetika. Diese stellen Peptide dar, die dem physiologischen IAP-Inhibitor Smac/DIABLO ähneln. In verschiedenen klinischen Studien wird der denkbare therapeutische Nutzen dieser Peptide derzeit untersucht (Gyrd-Hansen und Meier 2010; Jost et al. 2009; Wright und Duckett 2005).

1.4 TRAIL

1.4.1 TRAIL und seine Rezeptoren

Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) wurde durch zwei unabhängige Gruppen auf Grundlage der Sequenzhomologie zu TNF- α und CD95 (Pitti et al. 1996; Wiley et al. 1995) entdeckt. Wie die anderen Mitglieder der Liganden TNF-Superfamilie wird TRAIL vorwiegend als ein Typ II Transmembranprotein mit dem C-Terminus, das an der extrazellulären Seite lokalisiert ist und dem N-Terminus, welches an der zytoplasmatischen Seite lokalisiert ist, exprimiert (Abb. 10) (Liabakk et al. 2002).

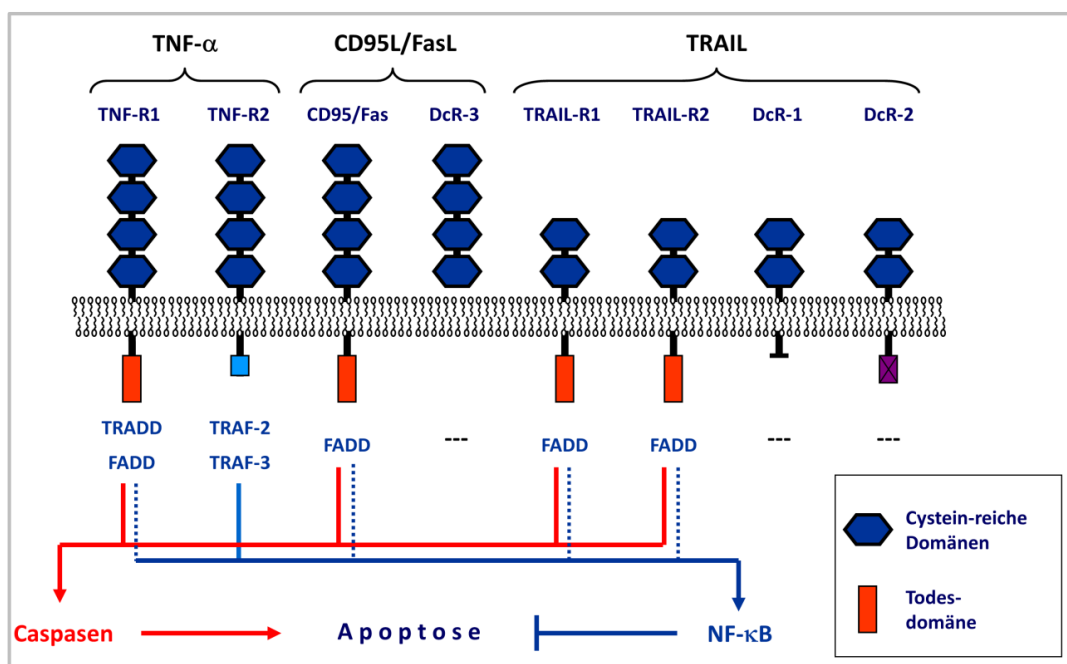


Abb. 10 Schematische Darstellung der bedeutsamsten Todesliganden und der entsprechenden Todesrezeptoren sowie nachgeschalteter Signalwege

(Eberle et al. 2007b)

Die extrazelluläre Domäne des TRAIL-Moleküls kann nach der Spaltung von TRAIL als gelöster Ligand vorliegen. Neben der Bindung an seine agonistischen Todesrezeptoren (death receptor 4 und 5; DR4 und DR5) kann TRAIL auch an drei antagonistische Decoy-Rezeptoren binden: DcR1 (TRAIL-R3), DcR2 (TRAIL-R4) und OPG (Osteroprotegerin) (Mahalingam et al. 2009). TRAIL-Decoy-Rezeptoren sind nicht in der Lage, das Todessignal weiterzuleiten, da sie über keine (DcR1) oder nicht funktionelle zytoplasmatische Todesdomänen (DcR2) verfügen, wodurch keine DISC-Formierung stattfinden kann. Sie konkurrieren somit mit DR4 und DR5 um die TRAIL-Bindungsstelle. TRAIL-Decoy-Rezeptoren wurden in verschiedenen Krebsarten entdeckt, jedoch konnte

bisher keine Verbindung mit deren Expression und einer TRAIL-Resistenz nachgewiesen werden (Zhang und Fang 2005). Dies lässt vermuten, dass andere Mechanismen als die Expression von Decoy-Rezeptoren zur TRAIL-Resistenz in Krebszellen führen.

Die agonistischen Rezeptoren DR4 und DR5 weisen in humanen Zellen wichtige Ähnlichkeiten in der Genstruktur und dem Genexpressionsmuster auf. Beide sind Transmembran-Rezeptoren vom Typ-I. DR4 und DR5 teilen sich Eigenschaften in der Cystein-reichen extrazellulären Domäne (66%) und in der Todesdomäne (64%) (Sheridan et al. 1997).

Verschiedenste Agenzien sind in der Lage, die Expression der TRAIL-Rezeptoren zu modulieren. Für Agenzien wie Chemotherapeutika, UV-Strahlung oder andere Substanzen wie Resveratrol konnte gezeigt werden, dass diese DR4 und DR5 u.a. über p53 hochregulieren können (Ivanov et al. 2008; Lu und El Deiry 2009) .

1.4.2 Aktivierung verschiedener Signalwege

Mittels der Bindung von TRAIL an DR4 und DR5 ist TRAIL in der Lage, die Initiatorcaspasen-8 und -10 durch die Bindung an die Todesdomäne (death domain; DD) des Adapterproteins FADD zu rekrutieren und zu aktivieren. TRAIL kann sowohl durch die Aktivierung von Caspase-8 und -10 direkt die Effektorcaspase-3 spalten (welche ihrerseits Todessubstrate spaltet und dadurch die Apoptose in Gang bringt), als auch den intrinsischen Signalweg durch die Spaltung von Bid aktivieren.

Durch die Bindung von TRAIL an DR4 und DR5 kann TRAIL ferner die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (nuclear factor kappa B) und der MAP-Kinase vermitteln (Di Pietro und Zauli 2004). Die Aktivierung dieser zwei Signalwege durch TRAIL wird durch TRADD (TNF-R1- associated death domain protein), TRAF2 (TNF receptor-associated factor 2) und RIP (receptor-interacting protein) vermittelt. Sie kommen unabhängig von Caspase-8 und -10 vor (MacFarlane 2003). Diese Hypothese wird sowohl durch dominant-negative TRADD- als auch TRAF2-Deletionsmutanten bestätigt, die eine Blockierung der TRAIL-induzierten NF- κ B Aktivierung aufweisen (Hu et al. 1999; Zhang und Fang 2005). Die Signalgebung von NF- κ B wird in Abschnitt 1.5 näher erläutert.

TRAIL ist ferner in der Lage, den JNK (c-Jun N-terminale Kinasen)-Signalweg zu aktivieren. Ein möglicher Signalweg, welcher zur Aktivierung des TRAIL-induzierten JNK Signalweges führt, wurde durch dominant-negative Mutanten für TRAF2, MEKK1 und MKK4 aufgezeigt, welche die TRAIL-induzierte JNK-Aktivierung blockierten.

Andererseits weisen dominant-negative Mutanten für NIK und IKK β , welche in die NF- κ B Aktivierung involviert sind, keinen inhibitorischen Effekt auf die TRAIL-induzierte JNK Aktivierung auf (Hu et al. 1999). Diese Daten lassen annehmen, dass die TRAIL-induzierte JNK-Aktivierung durch den TRAF2-MEKK1-MKK4-abhängigen Signalweg vermittelt wird und unabhängig von der NIK-IKK α/β Kaskade ist.

TRAIL kann zusätzlich zur Aktivierung der MAP-Kinase Erk1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2) führen. Der Erk1/2-Signalweg besitzt eine besondere Bedeutung, da er Zellen vor Apoptose, induziert durch die Behandlung verschiedener Stimuli, schützen kann. Studien konnten zeigen, dass die Aktivierung von ERK1/2 durch TRAIL die Expression von Bcl-2 und Bcl-x_L induzieren und folglich das Überleben einer Vielfalt von humanen Tumorzellen fördern kann (Tran et al. 2001). Die spezifische Inhibierung von aktivierten ERK1/2 resultiert in einer Herunterregulation des Expressionslevels vom antiapoptotischen Bcl-2-Proteins (Lee et al. 2006).

1.4.3 Anwendung von TRAIL in der Tumorthherapie

Todesliganden sind potenziell nützlich für die Krebstherapie. Im Gegensatz zu vielen anderen Krebstherapeutika induzieren sie Apoptose in Tumorzellen unabhängig von dem Tumorsuppressorgen p53, welches in mehr als der Hälfte der humanen Krebsarten inaktiviert ist (Wang und El Deiry 2003). Folglich könnten Todesliganden effektiv gegen Tumore wirken, die eine Resistenz gegen Chemotherapeutika oder Radiotherapie aufweisen.

Trotz dieses potentiellen Vorteils zeigte sich in klinischen Anwendungen von TNF- α und CD95L eine hohe Toxizität gegen normale Gewebezellen, die zum Tod von Tieren im experimentellen Modell führte (Ashkenazi 2002). Der intravenösen Gabe von TNF- α kann ein systemisches Inflammationssyndrom folgen, welches einem septischen Schock ähnelt, der durch die Aktivierung von dem proinflammatorischen NF- κ B in vaskulären Endothelialzellen und Makrophagen entstehen kann. Die Injektion des agonistischen anti-CD95-Antikörpers CH-11 induzierte in Hepatozyten Apoptose und bewirkte ein Lebersversagen im Mausmodell (Kelley und Ashkenazi 2004). Die Möglichkeit, von TRAIL Apoptose in einer hohen Vielfalt von Krebszelllinien zu induzieren, während es nur eine geringe Toxizität gegenüber normalen Zellen aufweist, lässt vermuten, dass dieses Molekül nützlich in der Krebstherapie sein könnte.

Viele Krebszelllinien unterschiedlichen Ursprungs wie Darm, Lunge, Brust, Prostata, Pankreas, Niere sowie von Lymphomen, Leukämien und multiple Myelomen weisen eine hohe Sensitivität gegenüber dem proapoptotischen Effekt von TRAIL auf (Ashkenazi 2002).

Die Gabe von TRAIL als Einzelbehandlung oder in der Kombination mit Chemotherapeutika oder Radiotherapie zeigte im Tiermodell mit humanen Xenografts eine solide Antitumoraktivität. Beispiele hierfür sind das Colonkarzinom- (Kelley et al. 2001; LeBlanc und Ashkenazi 2003; Naka et al. 2002), Gliom- (Fulda et al. 2002), multiple Myelom- und Lungenkrebs-Xenograft-Tumormodel (Mitsiades et al. 2001). Jedoch zeigte sich in klinischen Studien mit soliden Tumoren und Lymphomen von TRAIL und TRAIL-Rezeptor-Agonisten eine beschränkte Effektivität (Herbst et al. 2010; Younes et al. 2010).

Die synergistische Anwendung von TRAIL mit Antikrebstherapeutika ist zwingend notwendig. Apoptose, welche durch TRAIL induziert wurde, konnte u.a. durch die Kombination mit IFN- α (Qu et al. 2011), genotoxischen Agenzien wie Doxorubicin, Cisplatin oder auch Etoposid (Vaculova et al. 2010; Xu et al. 2011) und UVB-Bestrahlung (Hornle et al. 2011) verstärkt werden. Der diesem Synergismus zu Grunde liegende Mechanismus variiert zwischen den Therapieansätzen, umfasst aber u.a. die Heraufregulation der TRAIL-Todesrezeptoren, Modulation der Mitglieder der Bcl-2-Familie und die Inhibierung der Mitglieder der IAP-Familie.

Die therapeutische Behandlung von Krebszellen mit DR4 und DR5 spezifischen agonistischen Antikörpern könnte viel effizienter sein, als TRAIL, da viele Tumore durch die Expression von Decoy-Rezeptoren vor der TRAIL-induzierten Apoptose geschützt sind. Der Antitumoreffekt von agonistischen DR4 und DR5 Antikörper wie Lexatumumab, monoklonaler Antikörper gegen DR5, und Mapatumumab, monoklonaler Antikörper gegen DR4, konnten synergistisch in vitro mittels Chemotherapeutika wie Cisplatin verstärkt werden (Belyanskaya et al. 2007; Wu und Kakehi 2009). Leider zeigten sich auch hier in klinischen Studien nur geringe Effekte. Studien-Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkrebs zeigten nur ein geringes Ansprechen auf die Kombination mit dem rekombinanten humanen Apo2L/TRAIL Dulanermin, welches DR4 und DR5 aktiviert, in der Kombination mit Paclitaxel, Carboplatin und Bevacizumab (Soria et al. 2011).

Gegenwärtig gibt es zahlreiche aktuelle Studien, die das therapeutische Potential sowohl von Todesrezeptor spezifischen agonistischen Antikörpern alleine als auch in der Kombination mit Chemotherapeutika, Kinaseinhibitoren oder immunmodulatorischen Rezeptoren in unterschiedlichen Krebsentitäten wie dem Melanom, nicht-kleinzelligem

Lungenkrebs oder dem Non-Hodgkin Lymphom untersuchen (Quelle: www.ClinicalTrials.gov).

1.4.4 Resistenzentwicklung

Die Resistenz gegenüber TRAIL stellt die Hauptbarriere bei der Entwicklung einer effizienten Therapie dar (Wang und El Deiry 2003). Die Analyse, welche dem molekularen Mechanismus der TRAIL-Resistenz zu Grunde liegt, hat zur Identifizierung einiger charakteristischer Defekte im Mechanismus der Apoptose von Krebszellen geführt. Die TRAIL-Resistenz kann u.a. aus einer funktionellen Dysregulation, Mutation oder geringen Expression von DR4 und DR5 resultieren. Mutationen von DR4 kommen in bis zu 44% der Zellen des Ovarial-, Brust-, Blasen- und Lungenkrebs vor. Mutationen in dem für die DR5 Todesdomäne codierenden Genbereich konnten in bis zu 10% der Zellen von Kopf-, Hals-, nicht-kleinzelligem Lungen- und Brustkrebs, Non-Hodgkin Lymphomen und hepatozellulärem Karzinom identifiziert werden (Zhang und Fang 2005). Ferner konnte nachgewiesen werden, dass die funktionelle Expression von DR4 und DR5 mit der TRAIL-Resistenz in Zellen von Lungen-, Colon- und Brustkrebs in Verbindung steht (Jin et al. 2004; Kim et al. 2000). Des Weiteren konnte in dendritischen Zellen sowie in Melanom- und Neuroblastomzelllinien eine geringere Expression der Initiatorcaspasen-8 und -10 mit der TRAIL-Resistenz in Verbindung gebracht werden (Grotzer et al. 2000; Jin et al. 2004; Kim et al. 2000; Kurbanov et al. 2005). Aber auch die Überexpression von XIAP oder Survivin kann in einer TRAIL-Resistenz resultieren (Kawasaki et al. 1998; Sarela et al. 2001; Tanaka et al. 2000). In Tumorzellen vom Typ II ist die Liste der Moleküle, welche an der TRAIL-Resistenz beteiligt sind, auf alle zytoprotektiven Moleküle ausgedehnt, die an der Regulation des mitochondrialen Signalweges involviert sind. Beispielhaft hierfür ist die hohe Expression von Bcl-2 und Bcl-x_L, die mit einer TRAIL-Resistenz in diesen Zellen einhergehen können (Hinz et al. 2000; Sinicrope et al. 2004). Ferner konnte Mcl-1 (myeloid cell leukemia-1), das zu den antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen gehört als einer der möglichen Mediatoren, die zur Entwicklung der TRAIL-Resistenz führen kann, identifiziert werden (Gillissen et al. 2010).

Melanomzelllinien sind grundsätzlich sensitiv für TRAIL-induzierte Apoptose. Trotzdem können Melanomzelllinien eine vorhandene oder induzierbare Resistenz, die durch eine kontinuierliche Behandlung mit TRAIL erzeugt wird, aufweisen (Kurbanov et al. 2007; Zhang et al. 2006). Die induzierbare Resistenz in DR4-positiven Melanomzellen, die mit

TRAIL selektiert wurden, zeigte sich als transient (Kurbanov et al. 2007). Resistente Melanomzellen, welche mit TRAIL selektiert wurden, sind einerseits durch die Herunterregulation von DR4 und/oder DR5 und andererseits durch die Herunterregulation der Initiatorcaspasen und des proapoptischen Proteins Bid charakterisiert.

1.5 Die Signalgebung von NF- κ B

In Säugetierzellen besteht die Transkriptionsfaktorfamilie von NF- κ B aus fünf Mitgliedern: RelA (p65), RelB, cRel, NF- κ B1 (p50 und sein Vorläuferprotein p105) und NF- κ B2 (p52 und sein Vorläuferprotein p100). Die NF- κ B-Proteine lagern sich zu Homo- und Heterodimeren zusammen, welche funktionelle Strukturen darstellen. Prinzipiell können zwei NF- κ B-Signalwege unterschieden werden, der kanonische und der alternative NF- κ B-Signalweg (Abb. 11). Bei dem kanonischen Signalweg kommt es hauptsächlich zur Aktivierung von RelA/p50-Dimeren. Im unstimulierten Zustand liegen diese im Zytoplasma, gebunden durch I- κ B-Proteine (inhibitor of κ B), vor. Mittels einer Aktivierung durch eine hohe Diversität an Stimuli (TNF- α , IL-1, Virus-Infektion, genotoxische Substanzen oder ionisierende Strahlung) werden die I- κ B-Proteine an Serinresten durch den IKK- (I κ B kinase) Komplex phosphoryliert. Dieser Prozess hat eine Ubiquitinierung zur Folge, welche letztendlich zum proteasomalen Abbau der I- κ B-Proteine führt. Die somit freigesetzten RelA/p50-Dimere translozieren in den Kern. Dort wirken sie als Transkriptionsfaktoren. Vor allem in der angeborenen Immunantwort und in der Inflammation ist dieser NF- κ B-Signalweg von Bedeutung.

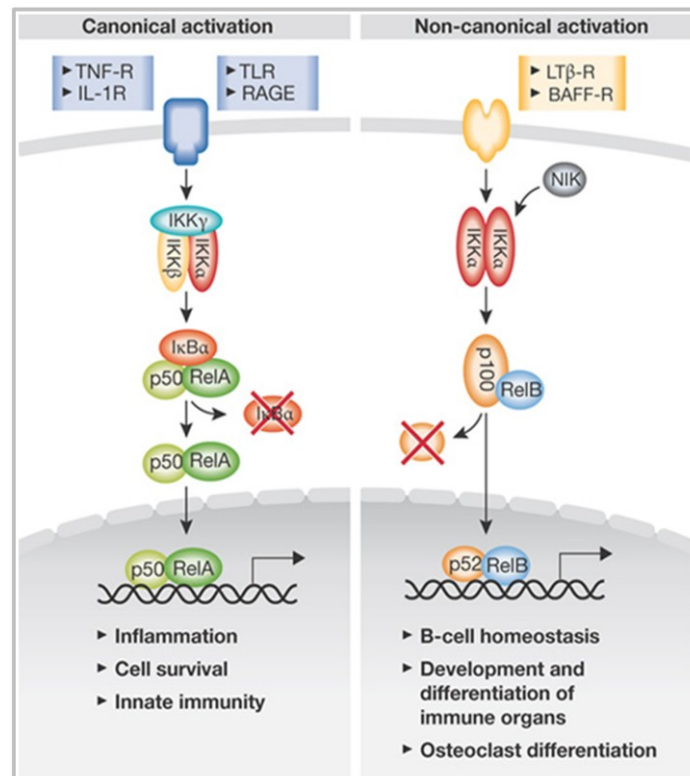


Abb. 11 NF- κ B-Signalwege.

Aktivierung des kanonischen (I- κ B α) und des NIK-abhängigen, alternativen NF- κ B-Signalweges. Erläuterungen siehe Abschnitt 1.5 (Bollrath und Greten 2009)

Der zweite, alternative Signalweg kann durch Mitglieder der TNF-Superfamilie (z.B. BAFF), Lymphotoxin β (LT β) oder der CD40-Ligand aktiviert werden. In diesem Signalweg wird IKK α durch NIK (NF- κ B-inducing kinase) aktiviert, woraufhin IKK α p100, den wichtigsten RelB-Inhibitor, phosphoryliert. Dies hat den proteosomalen Abbau von p100 zur Folge. Die RelB/p52- oder RelB/p50-Dimere translozieren in den Kern und führen zur Transkription von Genen. Verschiedene Untersuchungen geben Hinweise darauf, dass dieser Signalweg vorherrschend in der Entwicklung, Organisation und Funktion von sekundären lymphatischen Organen, als auch in der B-Zell-Reifung von Bedeutung ist. In der Aktivierung beider NF- κ B-Signalwege spielt der IKK-Komplex eine bedeutende Rolle. Dieser besteht aus zwei katalytischen Untereinheiten, IKK α und IKK β , sowie einer regulatorischen Untereinheit, IKK γ (NEMO) (Baud und Karin 2009).

Eine Inhibierung von Inflammation und den NF- κ B-Signalwegen ist durch ihre Involvement in das Zellwachstum und die Apoptoseresistenz auch therapeutisch bedeutsam. Zielprotein des NF- κ B-Signalweges sind neben den antiapoptotischen Bcl-2- und IAP-Proteinen der Caspasen-Inhibitor c-FLIP (cellular FLICE inhibitory protein) auch IKK β (Karin 2006; Karin 2009; Micheau et al. 2001; Vallabhapurapu und Karin 2009).

1.6 Proteinkinase-Inhibitoren

1.6.1 Proteinkinasen

In eukaryotischen Zellen sind Proteinkinasen essentiell an der Signaltransduktion beteiligt. Sie sind in der Lage mittels Phosphorylierung eine Phosphatgruppe zu übertragen. Durch Proteinkinasen kann die Aktivität verschiedenster Funktionsträger wie Enzymen, Ionenkanälen oder Transkriptionsfaktoren gesteuert werden (Schmidt und Lang 2007). Sie regulieren wichtige zelluläre Prozesse wie Proliferation, Zellwachstum, Zelldifferenzierung, Migration und ferner die Apoptose. Eine Dysfunktion von Proteinkinasen kann zu schweren pathophysiologischen Effekten im menschlichen Organismus führen (Sachsenmaier 2001). Bei einer Vielzahl von neurologischen und kardiovaskulären Erkrankungen sowie inflammatorischen und proliferativer Erkrankungen wie z.B. Psoriasis, rheumatoider Arthritis, Asthma und Krebs konnte eine Fehlregulation einzelner Proteinkinasen nachgewiesen werden. Eine Überfunktion von Kinasen ist speziell im Zusammenhang mit Krebs von großer Bedeutung. Die Hyperaktivität kann auf Faktoren wie Überexpression der Kinase, Verlust an inhibierenden Faktoren, Überexpression an stimulierenden Faktoren oder konstitutive Aktivität der Kinase zurückgeführt werden. In der Tumorgenese spielen Proteinkinasen eine wichtige Rolle bei Signaltransduktionsprozessen, die die Bereiche Angiogenese, Proliferation, Metastasierung, Überleben, Apoptose und Transkription betreffen (Melnikova und Golden 2004).

Die Proteinkinasen werden in Anlehnung an ihre Wirkungsspezifität in die Gruppe der Transferasen eingeordnet. In Eukaryoten erfolgt die Phosphorylierung an den Hydroxylgruppen von Serin-, Threonin- und Tyrosinresten der Substrate (Vulpetti und Bosetti 2004). In Abhängigkeit ihrer Substratspezifität ist eine Unterteilung der Proteinkinasen in Serin-/Threonin- und Tyrosinkinasen möglich (Druker und Lydon 2000; Sachsenmaier 2001). Im Folgenden werden diese näher erläutert:

Serin-/Threoninkinasen:

In der Gruppe der Serin-/Threoninkinasen konnte eine Anzahl von Enzymen mit Tumorerkrankungen in Verbindung gebracht werden. Wichtige Proteinkinasen sind hierfür z.B. die Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK, engl.: cyclin-dependent kinases), welche im Zusammenwirken mit Cyclinen zentrale Regulatoren des Zellzyklus darstellen (Huwe et al. 2003) und die RAF-Kinase des MAP-Kinase-Signalweges. RAF ist eine Proteinkinase, die durch die Rekrutierung von Ras an die Plasmamembran aktiviert wird (Wellbrock et al.

2004). Im aktivierten Zustand phosphoryliert RAF MEK und aktiviert dadurch die Proteinkinase, welche wiederum die Proteinkinase ERK phosphorylieren und folglich aktivieren kann. ERK ist in der Lage, zahlreiche zytosolische und nukleäre Proteine zu phosphorylieren (aktivieren), um u.a. die Genexpression und den Metabolismus zu regulieren. Folglich wird u.a. die Zellproliferation, Seneszenz, Differenzierung und das Überleben der Zelle geregelt (Inamdar et al. 2010).

BRAF ist ein Mitglied von der RAF-Familie (A-, B-, CRAF), welche zu den Serin/Threonin-Kinasen gehört. BRAF ist im Melanom von besonderer Bedeutung, da es in 50%-70% der Fälle mutiert ist. Dadurch ist der MAP-Kinase-Signalweg in vielen Fällen im Melanom konstitutiv aktiv (Davies et al. 2002; Kudchadkar et al. 2012).

Tyrosinkinasen:

Die Tyrosinkinasen werden in membranständige Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) und zytosolisch oder im Zellkern vorliegende Nicht-Rezeptor-assozierte Tyrosinkinasen (NRTK) gegliedert (Druker und Lydon 2000; Sachsenmaier 2001).

Von den Nicht-Rezeptor-assozierten Tyrosinkinasen sind etwa 32 zytoplasmatisch oder im Zellkern vorliegende, Kinasen bekannt. Die Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen besteht aus 58 Enzymen. Die Klassifizierung geht auf 20 Unterfamilien, basierend auf dem strukturellen Aufbau der Kinasen, zurück. Zu diesen gehören u.a. die Insulin-Rezeptoren und die epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren (EGFR; engl.: epidermal growth factor receptor).

1.6.2 Kinaseinhibitoren

Die an der Tumorgenese beteiligten Proteinkinasen stellen Angriffspunkte für diverse Inhibitionsstrategien dar. Hierbei scheint die Verwendung von niedermolekularen Proteinkinase-Inhibitoren und monoklonalen Antikörpern vielversprechende Ergebnisse zu zeigen.

Niedermolekulare Proteinkinase-Inhibitoren („small molecules“) sind Verbindungen, welche die Aktivität von Kinasen durch kompetitive oder irreversible Bindung in der ATP-Bindungstasche hemmen können. Möglichst selektiv sollten die Proteinkinase-Inhibitoren der ersten Generation eine einzelne oder wenige Proteinkinasen hemmen. Eine Anwendung hierfür stellt der Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib dar, der seit 2001 auf dem deutschen Markt zugelassen ist. Dieser sollte selektiv die Tyrosinkinasen Bcr-Abl, c-KIT

und PDGFR in ihrer Aktivität hemmen. Gute therapeutische Effekte hat Imatinib (Glivec) in frühen Erkrankungsphasen bei der chronischen myeloischen Leukämie. Im weiteren Verlauf der Behandlung kann jedoch die positive Wirkung nachlassen bzw. ganz verloren gehen. Dieser negative Effekt lässt sich auf eine Resistenzentwicklung zurückführen. Bei weiteren Proteinkinase-Inhibitoren konnte ebenfalls diese Entwicklung beobachtet werden (Blencke et al. 2004; Daub et al. 2004; Prien 2006). Weitere Kinaseinhibitoren, die eine Zulassung in Deutschland für die Tumorthherapie haben, sind u.a. Sorafenib (Nexavar) und Lapatinib (Tykerb). Sorafenib (Nexavar) ist zur Behandlung des chemoresistenten Nierenzellkarzinoms zugelassen. Als Multikinaseinhibitor kann Sorafenib neben der Aktivität von VEGF-R2 und -R3 die Enzyme BRAF, c-KIT, FLT3 und p38 hemmen (Rini 2006). Vielversprechende Ergebnisse in vitro konnten auch mit dem Derivat des Multikinaseinhibitors Indirubin aufgezeigt werden. Indirubin, ein Isomer des Indigos, soll in der Lage sein, Kinasen wie GSK-3 β , CDKs, c-Src und Fibroblastenwachstumsfaktor Rezeptor-1 FGFR1 zu inhibieren (Fibroblast growth factor receptor 1) (Meijer et al. 2003; Perabo et al. 2006; Zhen et al. 2007). Ein Beispiel stellt das Indirubin-Derivat 8-Rha- β dar, welches in Melanomzellen die Zellproliferation hemmen und Apoptose induzieren kann (Kunz et al. 2010).

Anfang 2012 wurde für die Melanomtherapie der selektive BRAF-Kinaseinhibitor Vemurafenib (PLX4032) auf dem deutschen Markt zugelassen. Dieser inhibiert selektiv die mutierte BRAF^{V600E}-Form (Bollag et al. 2010). Durch die Inhibition dieser konstitutiv aktiven BRAF-Form wird die antiapoptotische ERK-Signalkaskade unterbrochen und folglich die Zellproliferation gehemmt (Joseph et al. 2010). Nach einer randomisierten klinischen Versuchsreihe konnte gezeigt werden, dass Vemurafenib sowohl die Überlebens- als auch die Progressionsrate in der Primärtherapie im Vergleich zu Decarbazin erhöht (Chapman et al. 2011), sodass eine Zulassung von Vemurafenib durch die FDA (Food and Drug Administration) bereits 2011 in den USA erfolgte. Vemurafenib konnte eine vormals nie vorhandene hohe Ansprechrate in den Studien mit Patienten mit BRAF^{V600}-mutiertem metastasierten Melanom aufzeigen (Flaherty et al. 2010; Sosman et al. 2012). Jedoch zeigten sich bei in vitro Studien, dass Vemurafenib auch in der Lage ist, andere Kinasen wie ACK1, SRMS und MAP4K5 zu inhibieren. Es wird zwar spekuliert, dass es zum positiven Ansprechen von Melanompatienten auf Vemurafenib beiträgt, aber dies bedarf weiterer Untersuchungen (Bollag et al. 2010). Zusätzlich kann es auch zu Resistenzentwicklungen gegenüber Vemurafenib kommen. Dieser Effekt kann unterschiedlichste Ursachen haben, wie etwa die Reaktivierung des ERK-Signalweges

durch eine NRAS-Mutation (Nazarian et al. 2010) oder erhöhte Level an RAS-GTP und gesteigerte Phosphorylierung von AKT (Su et al. 2012).

Mittels der extrazellulären Bindung an eine Rezeptor-Tyrosinkinase oder durch die Interaktion mit dem natürlichen Kinaseliganden können monoklonale Antikörper die Signaltransduktion inhibieren. Ein Beispiel hierfür stellt der monoklonale Antikörper Cetuximab (Erbix), der 2004 zugelassen wurde, dar. Dieser Wirkstoff inhibiert den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR). Folglich ist eine Anwendung beim metastasierenden Kolorektalkarzinom als Kombinationstherapie und bei Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich in Kombination mit Strahlentherapie denkbar.

Ein weiteres Beispiel eines Nicht-Kinaseinhibitors stellt der anti-CTLA-4-Antikörper Ipilimumab dar. Diese Substanz ist der erste Wirkstoff, der im Jahr 2011 nach über 13 Jahren wieder für die Melanomtherapie zugelassen wurde. Die Tumoransprechrates bei Patienten mit malignem Melanom im Stadium III/IV beträgt 10%-15%, aber die Reduktion der Todeswahrscheinlichkeit im Vergleich zu einem Vakzin oder Decarbazin beträgt 34% bzw. 28% mit der Aussicht auf Heilung bei einigen Patienten (Hodi et al. 2010; Robert et al. 2011). Eine Möglichkeit für eine verbesserte Melanomtherapie mit einer höheren Überlebensrate könnten neue immuntherapeutische Wirkstoffe oder die Kombination von neuen Wirkstoffen mit Ipilimumab aufzeigen.

Aufgrund der Selektivität, einer eingeschränkten Wirksamkeit sowie der Entwicklung von Resistenzen bleibt künftig, ungeachtet der bisherigen klinischen Fortschritte von Kinaseinhibitoren in der Tumorthherapie insbesondere in der Melanomtherapie, die Entwicklung von Kinaseinhibitoren für eine effektive Langzeitbehandlung eine bedeutende Herausforderung. Die Kombinationstherapie von Signalweginhibitoren oder auch Multikinaseinhibitoren mit Antikörpern wie Ipilimumab oder mit TRAIL oder seinen agonistischen Antikörpern stellen eine mögliche Therapieoption für das maligne Melanom dar. Zahlreiche Versuchsreihen sind dazu bereits gestartet.

1.7 Fragestellung

Das maligne Melanom stellt einen aggressiven und therapieresistenten Tumor dar. Es ist hierbei von besonderem Interesse ein besseres Verständnis der Apoptoseregulation in dieser Tumorentität zu erhalten. Derzeit gibt es keine wirksame Therapie beim metastasierten malignen Melanom, daher ist die Entwicklung neuer Therapieansätze von hoher medizinischer Bedeutung.

Neben den neuen zugelassenen Therapeutika, dem BRAF^{600E}-Inhibitor Vemurafenib und dem anti-CTLA-4-Antikörper Ipilimumab, weist TRAIL und die agonistischen Antikörper gegen die TRAIL-Rezeptoren ein hoffnungsvolles therapeutisches Potential auf. Der apoptotische Effekt von TRAIL basiert auf seiner Fähigkeit selektiv eine Vielzahl von Krebszellen zu töten, während normale Zellen weitgehend unbeeinflusst sind. Ungeachtet dessen, zeigen bzw. entwickeln Melanomzellen eine TRAIL-Resistenz.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, in einer repräsentativen Auswahl von Melanomzelllinien mittels der verschiedenen Kinaseinhibitoren Indirubin 8-Rha- β , BMS-345541 und L-779450 die TRAIL-Resistenz zu überwinden. Hierbei wurde die Effizienz der Apoptoseinduktion, Zytotoxizität sowie Zellproliferation untersucht. Zur Klärung der Mechanismen sollte die Caspasenkaskade, der mitochondriale Apoptosesignalweg und schließlich die Bedeutung verschiedener Bcl-2-Proteine untersucht werden.

Das Projekt sollte zum besseren Verständnis der TRAIL-Resistenz und dessen Überwindung mittels unterschiedlicher Kinaseinhibitoren in Melanomzellen beitragen, um so denkbare Angriffspunkte des Melanoms definieren zu können. Letztendlich stellte das Ziel dieser Arbeit, eine Grundlage zur möglichen therapeutischen Nutzung von TRAIL in Kombination mit Kinaseinhibitoren beim Melanom dar. Diese könnte sich auf agonistischen Antikörpern der TRAIL-Rezeptoren, welche bereits in klinischen Studien eingesetzt wurden, in Kombination mit ausgewählten Kinaseinhibitoren, stützen.

2 Ergebnisse

2.1 Melanomzellkulturmodell von der TRAIL-Resistenz

Kurbanov et al. konnte bereits früher zeigen, dass in humanen Melanomzelllinien eine bestehende und induzierbare TRAIL-Resistenz vorliegen kann (Kurbanov et al. 2007). MeWo-Zellen und Mel-2a-Zellen (DR4-, DR5+) weisen eine TRAIL-Resistenz auf, wohingegen A-375-Zellen (DR4+, DR5+) und Mel-HO-Zellen (DR4-, DR5+) für TRAIL sensitiv sind. Zusätzlich entwickeln die A-375- und Mel-HO-Zellen eine induzierbare Resistenz nach kontinuierlicher Kultivierung mit TRAIL, was zu selektiert-resistenten Zellpopulationen führt (Mel-HO-TS, A-375-TS). Bei diesen Zelllinien wurde die Induktion der Apoptose durch TRAIL mittels der Sub-G1-Zellpopulation nach 24 h der Behandlung mit TRAIL (20 ng/ml) ermittelt. Zu diesem Zeitpunkt zeigten die A-375 eine stark erhöhte Anzahl (18%) und Mel-HO einen moderaten Anstieg (4%) an apoptotischen Zellen, wohingegen die anderen vier Zelllinien resistent blieben (Abb. 12A).

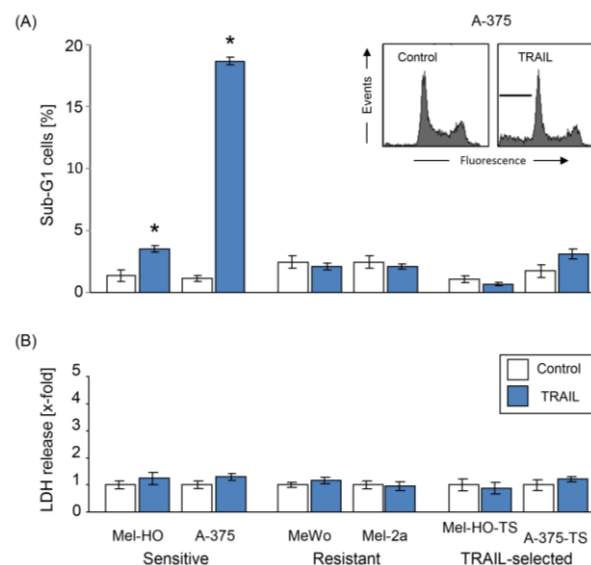


Abb. 12 Effekte von TRAIL

(A) Vier verschiedene Melanomzelllinien wurden 24 h mit 20 ng/ml TRAIL inkubiert. Anschließend wurden die apoptotische, hypodiploide Sub-G1-Zellpopulationen (in %) mit PI-Färbung mittels Durchflusszytometrie quantifiziert.

(B) Die Zytotoxizität wurde durch den Nachweis von LDH im Zellkulturüberstand bestimmt. Hierbei erfolgte die LDH-Messung parallel zur Bestimmung der Sub-G1-Zellpopulationen. Die LDH-Werte sind als Relativwerte zu verstehen. Diese sind bezogen auf die jeweiligen unbehandelten Kontrollen ($c=1$). (A, B) Dargestellt sind die Mittelwerte mit \pm SD eines repräsentativen Experiments von insgesamt drei unabhängigen Experimenten, welche jeweils mit Dreifachwerten durchgeführt wurden. Die Experimente zeigten vergleichbare Ergebnisse. Die Signifikanz wurde mittels Student'scher t-Verteilung berechnet und bei einem p-Wert von $< 0,05$ mit [*] gekennzeichnet.

Die Zytotoxizität war zu diesem Zeitpunkt nicht beeinflusst, wie durch die Bestimmung der LDH (Laktatdehydrogenase) im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden konnte (Abb.12B).

2.2 Sensitivierung für die TRAIL-induzierte Apoptose mittels des Multikinaseinhibitors Indirubin 8-Rha- β .

2.2.1 Effekte von Indirubin 8-Rha- β

Um Melanomzelllinien für TRAIL angreifbar zu machen, nutzten wir das Indirubin-Derivat 8-Rha- β . Sowohl die Synthese, als auch die Induktion der Apoptose und die Herunterregulation der Zellproliferation, konnten bereits in den Melanomzelllinien SK-Mel-29 und SK-Mel-147 beschrieben werden (Kunz et al. 2010). Die Abnahme der Zellproliferation durch das Indirubin 8-Rha- β konnte in dieser Studie auch für die Zelllinie A-375-TS gezeigt werden (Abb.13A). Dieser Effekt wurde durch einen G2-Arrest begleitet, der in A-375, Mel-2a und A-375-TS nachgewiesen werden konnte (Abb. 13B).

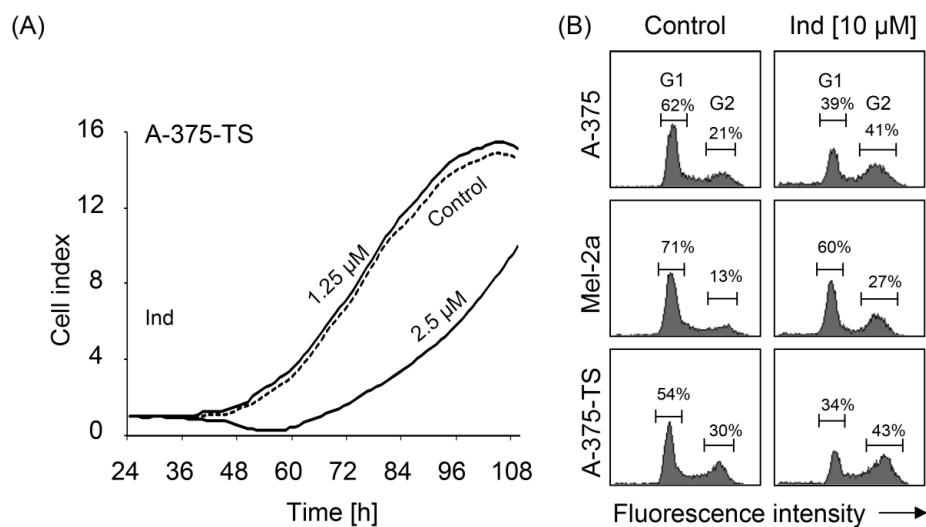


Abb. 13 Effekte von Indirubin 8-Rha- β

(A) Die RTCA wurde mit A-375-TS behandelt mit 1,25 und 2,5 μ M 8-Rha- β , durchgeführt. Die Zelldichte bei der Aussaat betrug 1250 Zellen pro Mikrotiter-Well. Die Behandlung fand nach 24 h statt und der Messzeitraum betrug 108 h. Der festgestellte Zellindex gibt eine relative Messung der Zellzahl an. Das Experiment wurde zweimal mit jeweils Dreifachwerten durchgeführt und lieferte hohe vergleichbare Ergebnisse.

(B) Die Zellzyklusanalyse wurde mittels PI-Färbung durch Durchflusszytometrie für A-375, Mel-2a und A-375-TS nach der Behandlung mit 10 μ M 8-Rha- β für 24 h (Vergleich zu Kontrollzellen) durchgeführt. Die Anzahl der Zellen in G1- und G2-Phase (%) sind innerhalb der Diagramme dargestellt.

2.2.2 Indirubin sensitiviert für die Todesliganden-induzierte Apoptose

Um Melanomzellen für die TRAIL-induzierte Apoptose zu sensitivieren, haben wir Kombinationen des Indirubin 8-Rha- β mit Todesliganden in dem beschriebenen Zellkulturmodell verwendet. Eine signifikante Induktion der Apoptose durch das Indirubin allein (10 μ M, 24h Behandlung) konnte in Mel-2a (4%), A-375 (7%) und A-375-TS (4%) beobachtet werden (Abb. 14A). Sehr auffallend war die synergistische Verstärkung der Apoptose durch die Kombination des Indirubins mit TRAIL. Dies resultierte in einer Verstärkung der Sub-G1-Zellpopulation von Mel-HO (15%), A-375 (32%), Mel-2a (14%) und A-375-TS (14%). Offensichtliche Effekte der Apoptose waren die reduzierte Zellzahl sowie abgerundete und abgelöste Zellen. Trotz dieser positiven Effekte blieben die Zelllinien MeWo und Mel-HO-TS resistent (Abb. 14A).

Die verstärkte Apoptose nahm auch starken Einfluss auf die Zellproliferation, die mittels der Echt-Zeit-Zell-Analyse (RTCA; engl.: real-time cell analysis) in den A-375-TS überwacht wurde. In diesen selektierten Zellen verminderte TRAIL nicht die Zellproliferation, stattdessen zeigten die Zellen nach TRAIL-Behandlung eine gesteigerte Zellproliferation. Die Kombination von Indirubin mit TRAIL zeigte sich jedoch als hoch effizient (Abb. 14B).

Um den Effekt von Indirubin auf die Apoptose-Sensitivität des CD95/Fas-Systems zu untersuchen, wurden A-375-Zellen für die CD95-Resistenz durch kontinuierliche Behandlung mit dem agonistischen Antikörper CH-11 selektiert. Die daraus resultierenden CH-11-selektierten A-375-CS-Zellen zeigten eine signifikant reduzierte Apoptose durch die CD95-Stimulation (5% vs. 12% in den parental A-375-Zellen). Indirubin war sowohl in der Lage, die Sensitivität von A-375 gegenüber der CH-11-induzierten Apoptose zu verstärken als auch die Resistenz von A-375-CS zu reduzieren (Abb. 14C und D).

Beide selektierten Zellpopulationen zeigten eine Kreuzresistenz für die jeweils anderen Todesliganden. Dadurch war A-375-TS größtenteils für CH-11 resistent und A-375-CS größtenteils für TRAIL resistent, was folglich parallele Signalwege für die Resistenz gegenüber Todesliganden vermuten lässt. Diese Kreuzresistenzen konnten ebenfalls durch Indirubin überwunden werden (Abb. 14E).

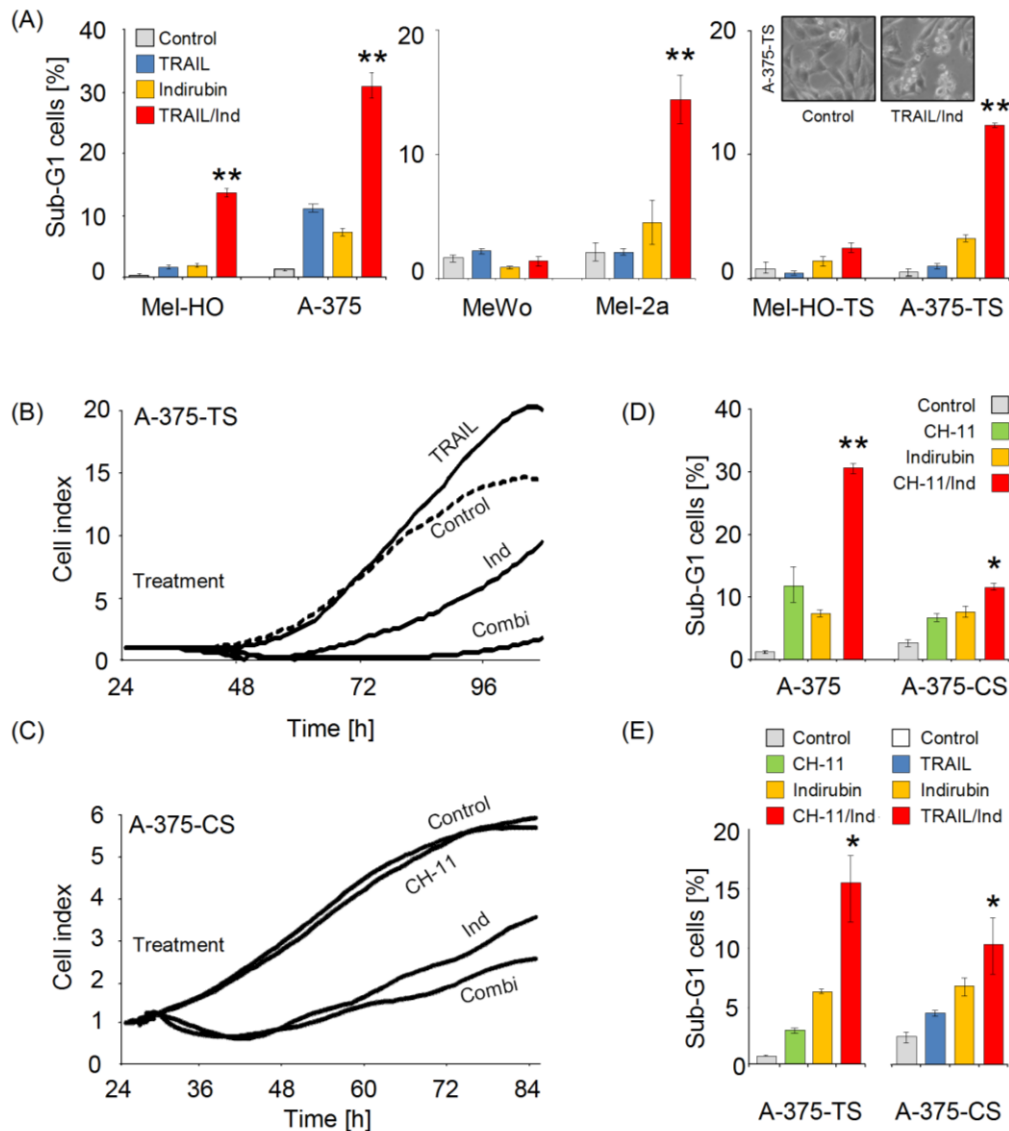


Abb. 14 Sensitivierung für Todesliganden-induzierte Apoptose

(A) Die Apoptoserate ist in Prozent der Sub-G1-Zellpopulationen (%) angegeben. Diese Werte wurden mittels Durchflusszytometrie nach PI-Färbung ermittelt. Die Zellen wurden, wie angegeben, mit Iridubin (10 μ M) und/oder TRAIL (20 ng/ml) behandelt.

(B) In der Echt-Zeit-Zell-Analyse (RTCA) wurde A-375-TS mit 2,5 μ M Iridubin, 20 ng/ml TRAIL oder der Kombination behandelt und analysiert. (C) RTCA von A-375-CS, welche mit Iridubin und/oder 50 ng/ml CH-11 behandelt wurde. (B, C) Die Zelldichte bei der Aussaat betrug 1250 Zellen pro Mikrotiter-Well und wurde mit dem Zeitpunkt der Behandlung (24 h) normalisiert. Die Experimente wurden jeweils zweimal mit je mit Dreifachwerten durchgeführt und zeigten vergleichbare Ergebnisse.

(D) Die Apoptoseinduktion durch CH-11 (50 ng/ml), Iridubin (10 μ M) oder der Kombination ist für A-375 und A-375-CS gezeigt.

(E) Die Kreuzresistenz für die Todesliganden TRAIL und CH-11. Links: A-375-TS mit CH-11 (50 ng/ml), Iridubin (10 μ M) oder der Kombination; rechts: A-375-CS TRAIL (20 ng/ml), Iridubin (10 μ M) oder der Kombination.

(A, D, E) Dargestellt sind die Mittelwerte mit \pm SD eines repräsentativen von insgesamt drei unabhängigen Experimenten, welche jeweils mit Dreifachwerten durchgeführt wurden. Die Experimente zeigten vergleichbare Ergebnisse. Die Signifikanz wurde bei einem p-Wert von $< 0,05$ mit [*] und $< 0,01$ mit [**] gekennzeichnet.

Zur Analyse der Apoptose-Induktion durch Indirubin wurde es jeweils mit den Chemotherapeutika Vinblastin, Paclitaxel und Doxorubicin kombiniert (Abb. 15A). Dafür wurden die A-375-Zellen simultan mit 8-Rha- β (10 μ M) und den Chemotherapeutika in den Konzentrationen von 1, 10 und 100 nM (Doxorubicin, Vinblastin) oder 1 und 10 nM (Paclitaxel) behandelt. Für Vinblastin konnte eine geringe Verstärkung der Apoptose in der Kombination beobachtet werden. Diese Effekte waren jedoch weniger als additiv. Paclitaxel zeigte bei einer Konzentration von 10 nM einen starken proapoptotischen Effekt auf A-375, welcher aber in der Kombination mit Indirubin vermindert war. Nur die Kombination mit 100 nM Doxorubicin wies eine signifikante Verstärkung der Apoptose über ein Zweifaches im Vergleich zu der Einzelbehandlung mit 8-Rha- β auf (Abb. 15A). Die Zytotoxizität war zum Zeitpunkt der Messung nach 24 h der Behandlung nicht beeinflusst (Abb. 15B).

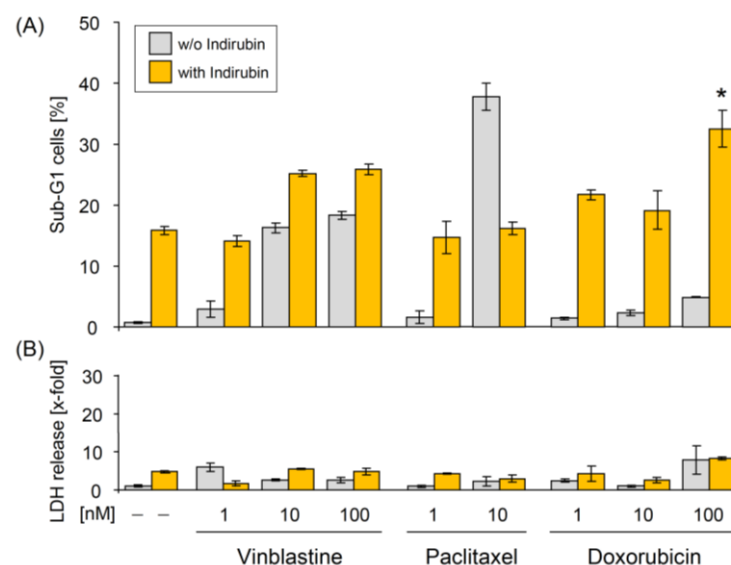


Abb. 15 Kombination von Indirubin mit Chemotherapeutika

(A) Die Apoptosewerte von A-375-Zellen sind in Prozent der Sub-G1-Zellpopulationen (%) angegeben. Diese Werte wurden mittels Durchflusszytometrie und PI-Färbung nach 24 h Behandlung ermittelt. Die Zellen wurden gleichzeitig mit Indirubin 8-Rha- β (10 μ M) jeweils in der Kombination mit Vinblastin (1, 10 und 100 nM), Paclitaxel (1 und 10 nM) und Doxorubicin (1, 10 und 100 nM) behandelt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit \pm SD eines repräsentativen von insgesamt zwei unabhängigen Experimenten (jeweils mit Dreifachwerten). Die Experimente zeigten vergleichbare Ergebnisse. Die Signifikanz wurde bei einem p-Wert von $< 0,05$ mit [*] gekennzeichnet (bezugnehmend auf die Kombination im Vergleich zu der Einzelbehandlung mit Indirubin).

(B) Die Zytotoxizität wurde durch den Nachweis von LDH im Zellkulturüberstand bestimmt. Hierbei erfolgte die LDH-Messung parallel zur Bestimmung der Sub-G1-Zellpopulationen. Die LDH-Werte sind als Relativwerte zu verstehen (c=1).

2.2.3 Volle Caspasenaktivierung in der Kombination von Indirubin mit TRAIL

Um zu verstehen, wie Indirubin in der Lage ist, für die TRAIL-induzierte Apoptose zu sensitivieren, wurde mittels Westernblot-Analyse die Aktivierung von Initiator- und Effektorcaspasen in A-375-TS-Zellen untersucht. Die extrinsische Caspasenkaskade mit den typischen Spaltprodukten der Initiatorcaspase-8 und der Effektorcaspase-3 wurde in A-375 durch TRAIL-Behandlung sichtbar. Dabei sind ein Verlust der Proform von Bid und die Prozessierung von Caspase-9 Indizien für die Aktivierung des mitochondrialen Signalweges. Ein Resultat der Caspase-3 Aktivität stellt die Spaltung ihres charakteristischen Substrats PARP dar (Abb. 16).

Es ist auffällig, dass A-375-TS ebenfalls eine sichtbare Prozessierung von Caspase-8 und auch das 20 kDa Spaltprodukt von Caspase-3 nach TRAIL-Behandlung aufweist. Diese 20 kDa Form erscheint nicht als aktiv, da PARP nicht gespalten wird (Abb. 16A).

Im Gegensatz dazu wies die Kombinationsbehandlung aus TRAIL mit Indirubin eine stärkere Prozessierung von Caspase-8 in A-375-TS auf. Zusätzlich konnten die 17 und 15 kDa großen Spaltprodukte von Caspase-3 unter diesen Bedingungen nachgewiesen werden, was repräsentativ für eine komplette Prozessierung der großen Untereinheit war. Dies ging mit der signifikanten Prozessierung von PARP einher. Ebenfalls konnte eine Aktivierung von Bid und Caspase-9 nach der Kombinationsbehandlung in A-375-TS gezeigt werden (Abb. 16A).

Um die Involvierung der Caspasen zu bestätigen, wurde der Pancaspase-Inhibitor zVAD-fmk eingesetzt. Die Vorbehandlung von zVAD-fmk hebt sowohl die Apoptoseinduktion in A-375 nach TRAIL-Behandlung als auch in A-375-TS nach Kombinationsbehandlung vollständig auf (Abb. 16B). Die Caspaseninhibierung resultierte auch in einer verbesserten Überlebensrate nach 24 h der Behandlung, wie mittels des WST-Assays nachgewiesen wurde, (Abb. 16C) und einer gesteigerten Zellproliferation, die mittels RTCA aufgezeigt werden konnte (Abb. 16D). Letztlich konnte durch die Caspaseninhibierung die Inhibierung der Zellproliferation von TRAIL in der Kombination mit Indirubin nur partiell reduziert werden, was vermuten lässt, dass Indirubin auch Protease-unabhängige Effekte aktivieren kann (Abb. 16D).

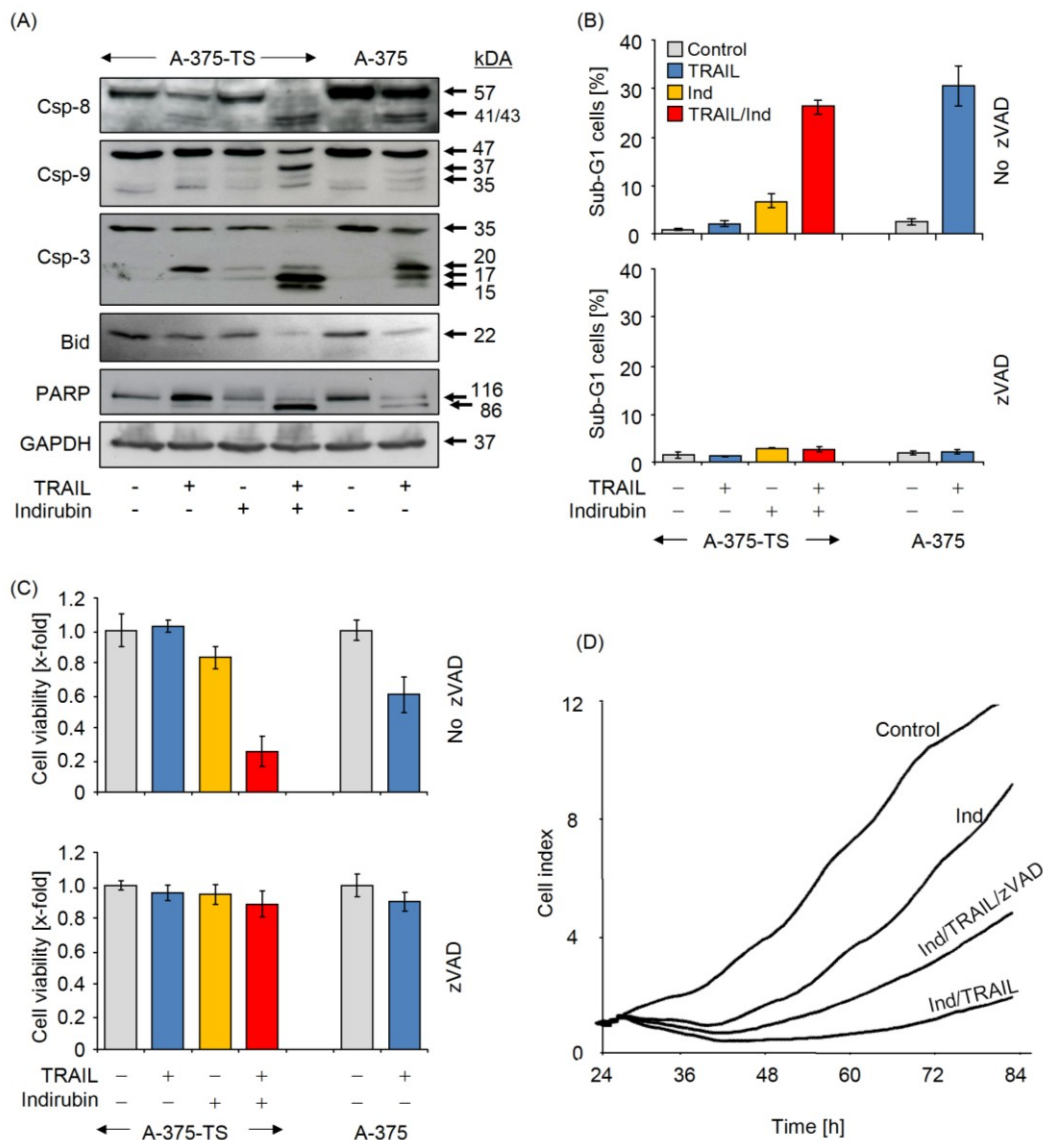


Abb. 16 Verstärkte Aktivierung von Caspasen in der Kombination von 8-Rha-βer/TRAIL

(A) Die Proteine von A-375 und A-375-TS wurden nach 8 h der Behandlung mit TRAIL (20 ng/ml), Indirubin (10 μ M) oder der Kombination extrahiert, mittels Westernblot analysiert und mit Kontrollzellen verglichen. Gleiche Proteinladung (30 μ g/Bahn) sowie ein gleichmäßiger Proteintransfer wurden mittels Ponceau-Färbung und GAPDH-Expression bestätigt. Das Molekulargewicht ist in kDa angegeben.

(B) Dargestellt ist die Apoptoseinduktion für A-375 und A-375-TS ohne die Zugabe von zVAD (oben) oder mit Vorinkubation von zVAD (10 μ M) für 1 h (unten). Weitere Behandlungen: Indirubin (10 μ M) und/oder TRAIL (20 ng/ml).

(C) Dargestellt ist die relative Zellvitalität, welche mittels WST-Assay ermittelt wurde; hierfür wurden behandelte A-375 und A-375-TS Zellen auf die unbehandelten Kontrollen (C = 1) normalisiert. Die Zellen wurden für 1 h mit zVAD-fmk (10 μ M, unten) vorbehandelt, bevor die Behandlung mit Indirubin (2,5 μ M) und/oder TRAIL (20 ng/ml) beginnen konnte. Der Vergleich erfolgte mit Zellen, die nicht mit zVAD behandelt wurden (oben).

(D) RTCA von A-375-TS mit Indirubin (2,5 μ M) allein, in der Kombination mit TRAIL (20 ng/ml) oder in der Dreifachkombination mit TRAIL und zVAD-fmk (10 μ M) behandelt. Die Zelldichte bei der Aussaat betrug 1250 Zellen pro Mikrotiter-Well und wurde mit dem Zeitpunkt der Behandlung (24 h) normalisiert. Die Experimente wurden jeweils zweimal mit je Dreifachwerten wiederholt und zeigten vergleichbare Ergebnisse.

2.2.4 Aktivierung des mitochondrialen Signalweges in der Kombination von Indirubin mit TRAIL

Die Beteiligung des mitochondrialen Apoptosesignalweges wurde offensichtlich nach der Messung des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\psi_m$, dessen Abnahme in apoptotischen Zellen charakteristisch ist. Dieser Effekt war in A-375-TS komplett blockiert, wohingegen in über 40 % der A-375-Zellen TRAIL stark $\Delta\psi_m$ verminderte. Indirubin allein reduzierte in A-375-TS im geringen Maße $\Delta\psi_m$, dessen Abnahme weiter in der Kombination mit TRAIL verstärkt wurde. Folglich ist Indirubin in der Lage, den TRAIL-vermittelten Effekt vollständig wiederherzustellen (Abb. 17A und B).

Die Vorinkubation mit zVAD-fmk konnte nur partiell den Verlust von $\Delta\psi_m$, welcher durch Indirubin allein induziert wurde, blockieren, konnte aber den weiteren Effekt, der von TRAIL stammt, vollständig inhibieren. Folglich scheint die mitochondriale Antwort durch TRAIL unterhalb der frühen Caspasenkaskade gelegen (Abb. 17A und B).

Eine Analyse der Zeitkinetik zeigte, dass der $\Delta\psi_m$ Effekt von Indirubin und von der Kombination 8 h nach der Behandlung eintrat (Abb. 17C), was parallel mit der Induktion der Apoptose zu beobachten war (Abb. 17D).

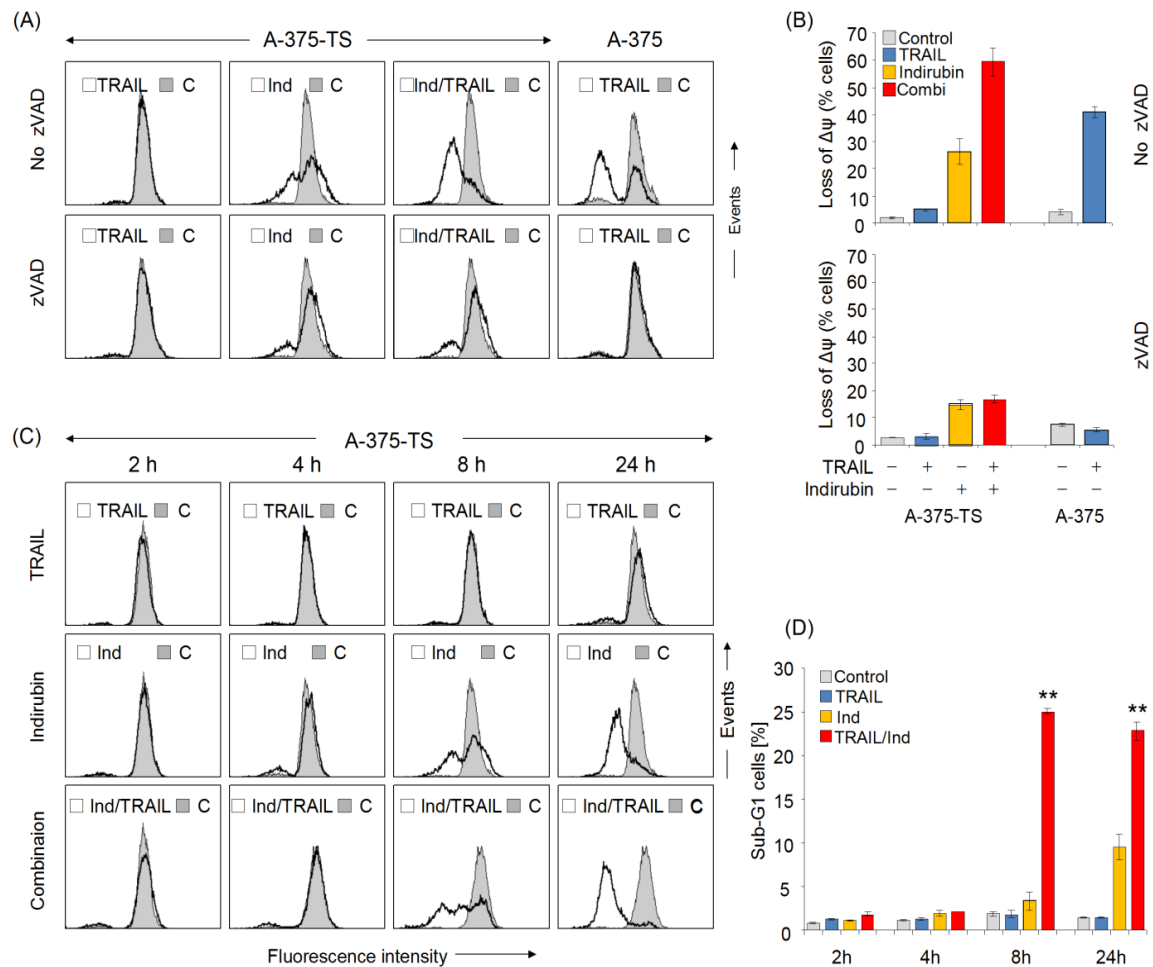


Abb. 17 Reaktion der Mitochondrien auf Indirubin

(A) Der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\psi_m$) wurde nach Behandlung (24 h) mit TRAIL (20 ng/ml), Indirubin (10 μ M) oder der Kombination für A-375 und A-375-TS mittels Durchflusszytometrie nach TMRM-Färbung ermittelt (oben). Histogramme der nicht-behandelten Kontrollen, C, sind grau dargestellt. Ein Vergleich ist für die Zellen gezeigt, welche mit zVAD-fmk für 1 h vorinkubiert wurden (unten).

(B) Quantifizierung von (A).

(C) Der Verlust von $\Delta\psi_m$ ist für A-375-TS-Zellen in einer Zeitkinetik für 2, 4, 8 und 24 h behandelt mit 10 μ M Indirubin, 20 ng/ml TRAIL oder der Kombination gezeigt. ((A) und (C)) Die Experimente wurden zwei- bis dreimal mit jeweils Dreifachwerten wiederholt und zeigten hohe vergleichbare Ergebnisse. (D) Die Apoptose wurde parallel zu (C) gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit \pm SD eines von zwei repräsentativen Experiments. Die Signifikanz wurde bei einem p -Wert von $< 0,01$ mit [**] gekennzeichnet. Hierbei wurden die Zellen, welche mit der Kombination behandelt wurden, mit denen, die mit Indirubin allein behandelt wurden, verglichen.-

Die Freisetzung von mitochondrialen Faktoren in das Zytosol ist ein Hinweis auf den mitochondrialen proapoptischen Signalweg. In der Tat konnte die Westernblot-Analyse von A-375 8 h nach TRAIL-Behandlung eine signifikante Freisetzung von Cytochrom C und AIF aufzeigen. Dies war nicht in den TRAIL-behandelten A-375-TS-Zellen zu sehen.

Dieses Defizit von A-375-TS konnte komplett durch die Kombination mit Indirubin wiederhergestellt werden (Abb. 18).

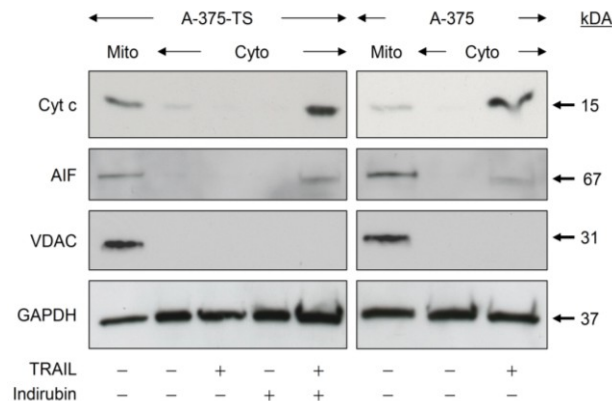


Abb. 18 Freisetzung von mitochondrialen Faktoren

Die mitochondriale Fraktion (Mito) und die zytosolische Fraktion (Cyto) wurden aus A-375-TS- und A-375-Zellen isoliert, nachdem diese für 8 h für Indirubin (10 μ M), TRAIL (20 ng/ml) oder der Kombination behandelt wurden. Für die zytosolischen Extrakte wurden mitochondriale Extrakte als Kontrollen aufgetragen und umgekehrt. Der Nachweis von VDAC schloss eine Kontamination der zytosolischen Extrakte mit Mitochondrien aus. Ein gleichmäßiger Proteintransfer wurde mittels Ponceau-Färbung bestätigt und mittels GAPDH-Expression wurde eine gleichmäßige Ladung der zytosolischen Extrakte nachgewiesen. Das Experiment wurde einmal wiederholt und zeigte vergleichbare Ergebnisse.

2.2.5 Indirubin überwindet die Apoptoseresistenz von Bcl-2

Bcl-2 ist ein kritischer Regulator in Melanomzellen. Um abzuschätzen, ob Bcl-2 oder Indirubin stärker in A-375-Zellen wirken, wurden A-375-Zellen, welche stabil mit einem Bcl-2-Konstrukt transfiziert wurden, verwendet (A-375-Bcl-2) und mit Mock-transfizierten Zellen verglichen (A-375-Mock). Die ektopische Überexpression von Bcl-2 resultiert in einer vollständigen TRAIL- und CD95-Resistenz (Kurbanov et al. 2005; Raisova et al. 2001). Dies konnte auch mit diesen Experimenten bestätigt werden (Abb. 19A und B). Im Gegensatz zu dem reduzierten TRAIL-Effekt, konnte der proapoptotische Effekt von Indirubin in A-375-Bcl-2-Zellen im Vergleich zu A-375-Mock nicht verringert werden.

Im Einzelnen war die TRAIL- und CH-11-Resistenz der A-375-Bcl-2-Zellen jeweils signifikant vermindert in der Kombination mit Indirubin. Nach Auswertung der Quantifizierung der Sub-G1-Population kann gesagt werden, dass die Bcl-2-Überexpression in 12% (TRAIL, 5% Indirubin), 22% (TRAIL, 10% Indirubin) und 8% (CH-11, 10% Indirubin) der apoptotischen Zellen resultiert (Abb. 19A und B). Folglich war Bcl-2 in der Lage, die Apoptose durch Indirubin und Todesliganden zu reduzieren, aber nicht vollständig zu blockieren. Im Gegensatz dazu konnte der Verlust von $\Delta\psi_m$

komplett in A-375-Bcl-2 blockiert werden, was für eine komplette Aufhebung des mitochondrialen Signalweges spricht (Abb. 19C). Folglich scheint die verbleibende Apoptose unabhängig von den Mitochondrien zu sein.

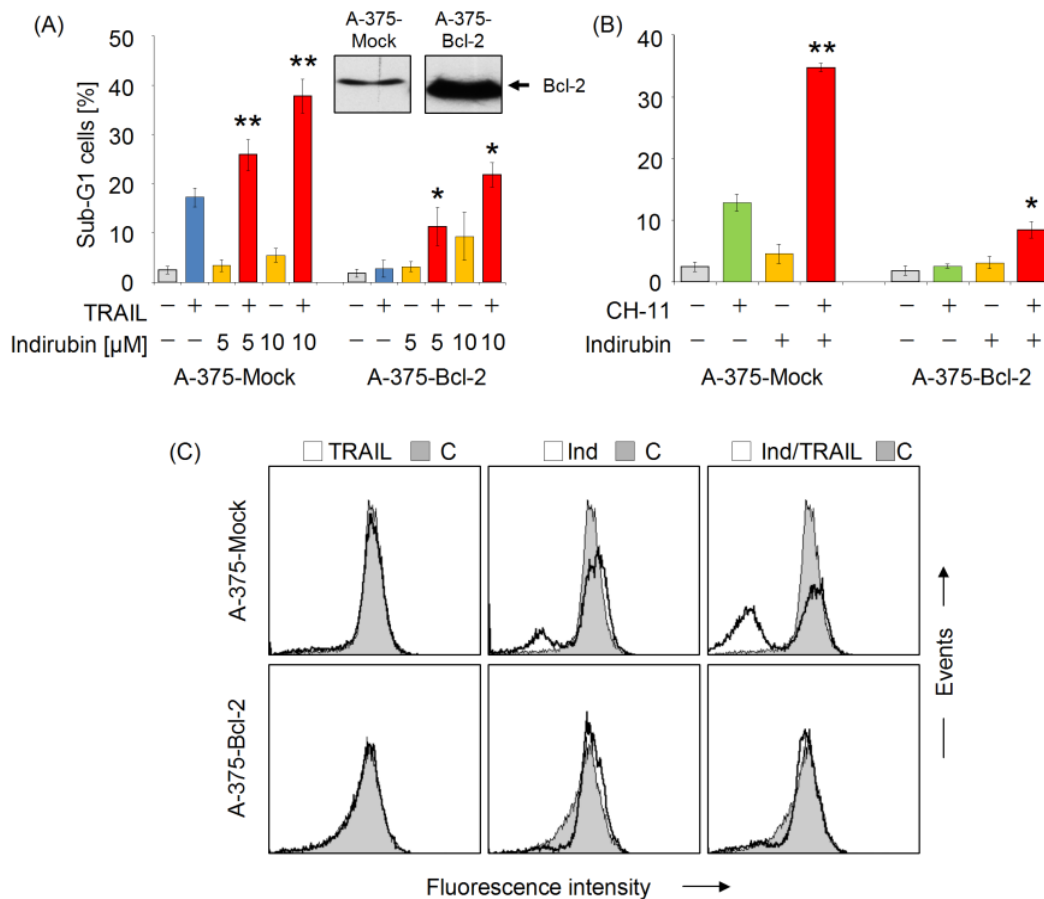


Abb. 19 Effekt von Indirubin auf Bcl-2 überexprimierende Zellen

(A und B) Klone von A-375, stabil transfiziert mit einem Bcl-2-pIRES-Expressions-Konstrukt (Bcl-2) oder einem pIRES-transfizierten Kontroll-Klon (Mock), wurden mit Indirubin (5 μM oder 10 μM; 8 h), TRAIL (20 ng/ml), CH-11 (50ng/ml) oder der Kombination behandelt und anschließend die Apoptose bestimmt. Die Balken stellen Mittelwerte \pm SD von einem repräsentativen von drei unabhängigen Experimenten dar, von denen jedes Experiment aus Dreifachwerten bestand. Die unabhängigen Experimente lieferten vergleichbare Ergebnisse. Die Signifikanz wurde bei einem p-Wert von $< 0,05$ mit [*] und von $< 0,01$ mit [**] gekennzeichnet. Hierfür wurden die Zellen, welche mit der Kombination behandelt wurden, mit denen, die mit Indirubin allein behandelt wurden, verglichen. Die Einfügung zeigt die Bcl-2 Überexpression in A-375-Bcl-2

(C) Der Verlust von $\Delta\psi_m$ wurde für A-375-Bcl-2 und A-375-Mock mittels Durchflusszytometrie nach TMRM-Färbung bestimmt. Die Zellen wurden für 8 h mit Indirubin (10 μM), TRAIL (20 ng/ml) oder der Kombination behandelt. Diese wurden mit der unbehandelten Kontrolle (grau) verglichen. Das Experiment wurde zweimal wiederholt und zeigte vergleichbare Ergebnisse.

2.2.6 Effekte von Indirubin auf die Bcl-2-Proteine und die cIAPs

Kinase-abhängige Signalwege, welche unter Umständen durch Indirubin blockiert werden können, sind häufig mit der Expression von Apoptoseregulatoren in Verbindung zu bringen. Von der Familie der Bcl-2-Proteine wurden antiapoptotische (Mcl-1, Bcl-2), proapoptotische Multidomän- (Bax, Bak) und proapoptotische BH3-only Proteine (Bad, Noxa, Puma) mittels Westernblot analysiert. Zusätzlich wurden auch XIAP und Survivin untersucht. Hinsichtlich der Bcl-2-Proteine war der zentrale Apoptoseregulator Bax in A-375-TS signifikant 8 h nach Indirubin-Behandlung heraufreguliert, wohingegen das funktionell verwandte Protein Bak nicht beeinflusst wurde. Von den drei untersuchten BH3-only Proteinen war Bad durch Indirubin signifikant heraufreguliert. Im Kontrast dazu resultiert die Kombination in A-375-TS in der Herunterregulation dieser Proteine, was als eine Art Gegenregulation zu betrachten ist (Abb. 20).

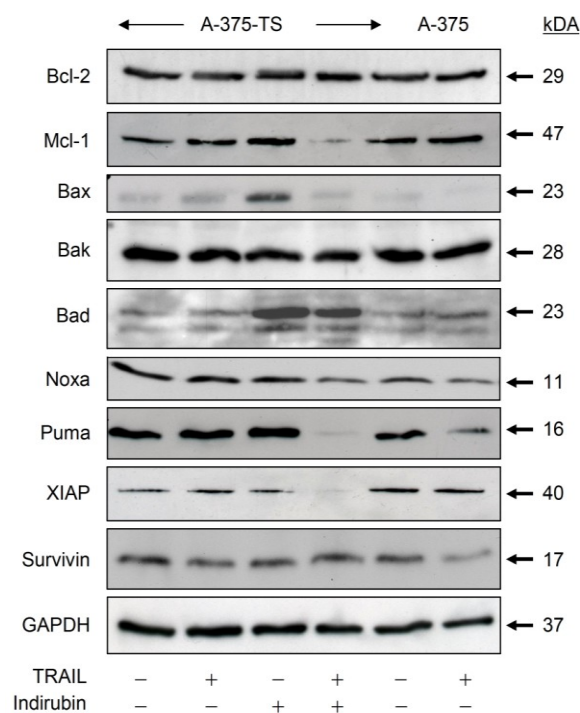


Abb. 20 Expression von Bcl-2-Proteinen und cIAPs

Die Expression der Apoptoseregulatoren wurde in A-375-TS- und A-375-Zellen mittels Westernblot analysiert. Hierfür wurden die Zellen mit Indirubin (10 μ M) und/oder TRAIL (20 ng/ml) für 8 h behandelt. Gleiche Proteinladung (30 μ g/Bahn) sowie ein gleichmäßiger Proteintransfer wurden mittels Ponceau-Färbung und GAPDH-Expression bestätigt. Das Molekulargewicht ist in kDa angegeben. Die Experimente wurden mindestens zweimal durchgeführt und zeigten vergleichbare Ergebnisse.

2.2.7 Effekte von Indirubin auf die Todesrezeptoren und p53

Die Expression der agonistischen Rezeptoren DR4 und DR5 ist elementar für die TRAIL-Sensitivität. Charakteristisch für die A-375-TS-Zellen ist die reduzierte Oberflächenexpression von DR4 und DR5 im Vergleich zu den parentalen A-375-Zellen (Kurbanov et al. 2007). Bedeutend ist, dass TRAIL stark die Oberflächenexpression von beiden Todesrezeptoren bereits 8 h nach Behandlung verminderte. Diese negative Resonanzschleife hilft, die schnelle Entwicklung der TRAIL-Resistenz in Melanomzellen zu verstehen (Abb. 21A).

Die Behandlung mit Indirubin allein stellte die hohe Expression der Todesrezeptoren in A-375-TS wieder her, was sowohl in der Oberflächenexpression (Abb. 21A) als auch mittels Westernblot-Analyse von Gesamtproteinextrakten beobachtet werden konnte (Abb. 21B). Die Behandlung von TRAIL resultiert in der Kombination mit Indirubin erneut in der Herunterregulation der Rezeptoren, was das hoch sensitive Gleichgewicht, welches die TRAIL-Sensitivität reguliert, widerspiegelt.

Ein Hauptregulator in der Apoptose stellt der Transkriptionsfaktor und Tumorsuppressor p53 dar, der u.a. die Expression der Todesrezeptoren und der proapoptischen Bcl-2-Proteine aktivieren kann. In Übereinstimmung mit der Hochregulation von Bax, Bad, DR4 und DR5 konnte eine deutliche Heraufregulation von p53 mittels Westernblot-Analyse nachgewiesen werden, was zum Teil die apoptotische Reaktion erklären könnte (Abb. 21B).

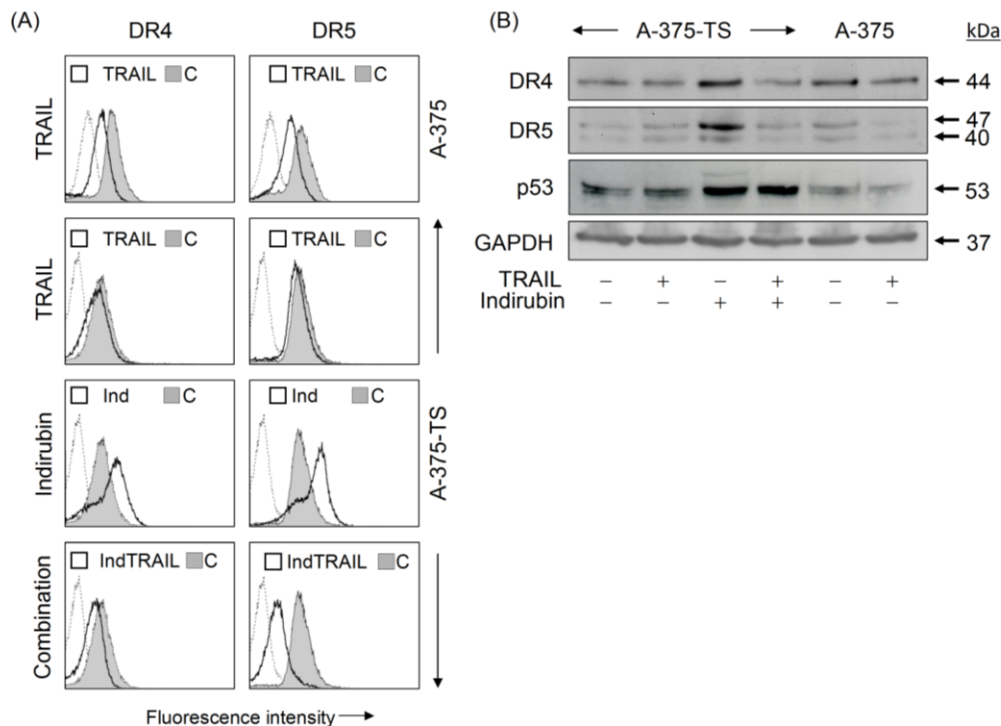


Abb. 21 Expression von Todesrezeptoren und p53

(A) Die Oberflächenexpression von Todesliganden (TRAIL-R1/DR4 und TRAIL-R2/DR5) wurde für A-375-TS- und A-375-Zellen mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Hierfür wurden die Zellen nach einer Behandlung für 8 h mit Indirubin (10 μ M), TRAIL (20 ng/ml) oder der Kombination (offene Graphen, kontinuierliche Linie) mit spezifischen Antikörpern gegen TRAIL-R1/DR4 und TRAIL-R2/DR5 gefärbt und zur entsprechenden Isotypkontrolle (offener Graph) verglichen. Die unbehandelten Kontrollen (gefüllte Graphen) dienten zum Vergleich zu den behandelten Kontrollen.

(B) Die Expression von DR4, DR5 und von p53 wurde mittels Westernblot in A-375-TS- und A-375-Zellen ermittelt. Gleiche Proteinladung (30 μ g/Bahn) sowie ein gleichmäßiger Proteintransfer wurden mittels Ponceau-Färbung und GAPDH-Expression bestätigt. Das Molekulargewicht ist in kDa angegeben. Die Experimente wurden mindestens zweimal durchgeführt und zeigten vergleichbare Ergebnisse. Hierfür wurden die Zellen mit Indirubin (10 μ M) und/oder TRAIL (20 ng/ml) für 8 h behandelt. Die Experimente wurden zweimal durchgeführt und zeigten vergleichbare Ergebnisse.

Um den Beitrag der Todesrezeptoren DR4 und DR5 an der TRAIL/Indirubin-induzierten Apoptose zu bestätigen, wurden selektive antagonistische Antikörper angewendet. Deutlich zu beobachten war, dass die TRAIL/Indirubin-induzierte Apoptose in den A-375 und A-375-TS fast vollständig mittels des DR4-antagonistischen Antikörpers blockiert werden konnte (60%), wohingegen der DR5-antagonistische Antikörper nur einen geringen Effekt aufwies (Abb. 22). Diese Experimente bestätigen, dass Indirubin den TRAIL-induzierten Apoptosesignalweg mittels der Todesliganden spezifisch verstärken kann.

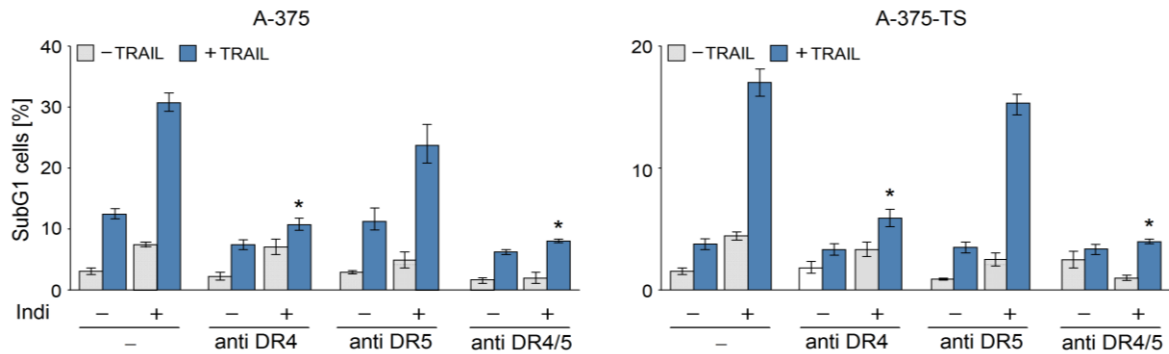


Abb. 22 Blockierung der Todesrezeptoren DR4 und DR5 reduziert die Indirubin/TRAIL vermittelte Apoptose

A-375-TS- und A-375-Zellen wurden für 1 h mit blockierenden Antikörpern gegen DR4 und/oder DR5 vorbehandelt, bevor diese mit Indirubin (10 μ M) und/oder TRAIL (20 ng/ml) für 8 h behandelt wurden. Anschließend wurden die Apoptosewerte nach PI-Färbung und mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Die Balken stellen Mittelwerte \pm SD von einem repräsentativen von zwei unabhängigen Experimenten dar, von denen jedes Experiment aus Dreifachwerten bestand. Die unabhängigen Experimente lieferten vergleichbare Ergebnisse. Die Signifikanz wurde bei einem p -Wert von $< 0,05$ mit [*] gekennzeichnet.

Auch sollte mit p53-defizienten HCT-116-Subklonen die bedeutende Rolle von p53 in der TRAIL/Indirubin-induzierten Apoptose bestätigt werden. Die Apoptose konnte zu über 60% in den p53-defizienten Zellen gegenüber den Wildtypzellen reduziert werden (Abb. 23). Folglich untermauern auch diese Experimente die bedeutende Rolle von p53 als ein Hauptregulator in der TRAIL/Indirubin-induzierten Apoptose (Abb. 23).

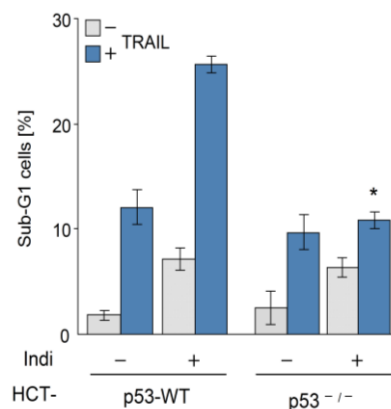


Abb. 23 Effekt von Indirubin auf HCT-116 p53^{-/-}-Zellen

Die Apoptose wurde durch Indirubin/TRAIL in Wildtyp-HCT-116 und deren p53-defizienten Subklonen induziert und nach PI-Färbung mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit \pm SD eines von zwei repräsentativen Experiments. Die Signifikanz wurde bei einem p -Wert von $< 0,05$ mit [*] gekennzeichnet.

2.3 Sensitivierung für die TRAIL-induzierte Apoptose mittels dem Kinaseinhibitor BMS-345541

2.3.1 Direkte Effekte von BMS-345541 auf die Apoptose und die NF- κ B-Aktivierung

Um Strategien für die Überwindung der TRAIL-Resistenz zu identifizieren, wurde der Kinaseinhibitor BMS-345541 verwendet. Die Behandlung mit BMS-345541 alleine resultierte in einem partiellen G2-Arrest, was bei 24 h in den Melanomzelllinien A-375, Mel-HO, MeWo und Mel-2a beobachtet werden konnte (Abb. 24A). Höhere Konzentrationen an BMS-345541 ($> 10 \mu\text{M}$) resultiert auch in der Induktion der Apoptose (10-15%), wohingegen nur moderate proapoptotische Effekte nach Behandlung mit 2-5 μM gesehen wurden (Abb. 24B). Eine geringe Verstärkung der Zytotoxizität (LDH-Freisetzung) trat parallel mit der Apoptose auf (Abb. 24C).

Die inhibierende Aktivität von BMS-345541 gegenüber NF- κ B wurde mittels der Kombination mit TNF- α überprüft. Die Degradation von I- κ B α in A-375 bei 15 min, die nukleäre Translokation der NF- κ B-Untereinheit p65 und die verstärkte nukleäre p65 DNA-Bindung 1 h konnte durch die Behandlung von TNF- α mit 2 μM BMS-345541 gemindert werden (Abb. 24D und F).

Die nukleäre p65 DNA-Bindungsaktivität war auch durch TRAIL-Behandlung verstärkt (4-fach bei 1 h), welche ebenfalls durch BMS-345541 reduziert wurde (Abb. 24F). Wie auch immer konnte keine Verstärkung vom nukleären Leveln an p65 und kein Verlust an I- κ B α in Reaktion auf TRAIL zu frühen Zeiten nach Behandlung beobachtet werden, was andere Wege der NF- κ B-Aktivierung vermuten lässt (Abb. 24E). Dennoch vermindert BMS-345541 die nukleären Level von p65 16 h nach Behandlung. Dies konnte in A-375 und in A-375-TS beobachtet werden (Abb. 24G), was aber nicht die frühen Effekte von BMS-345541 erklärt, die im Folgenden aufgezeigt werden.

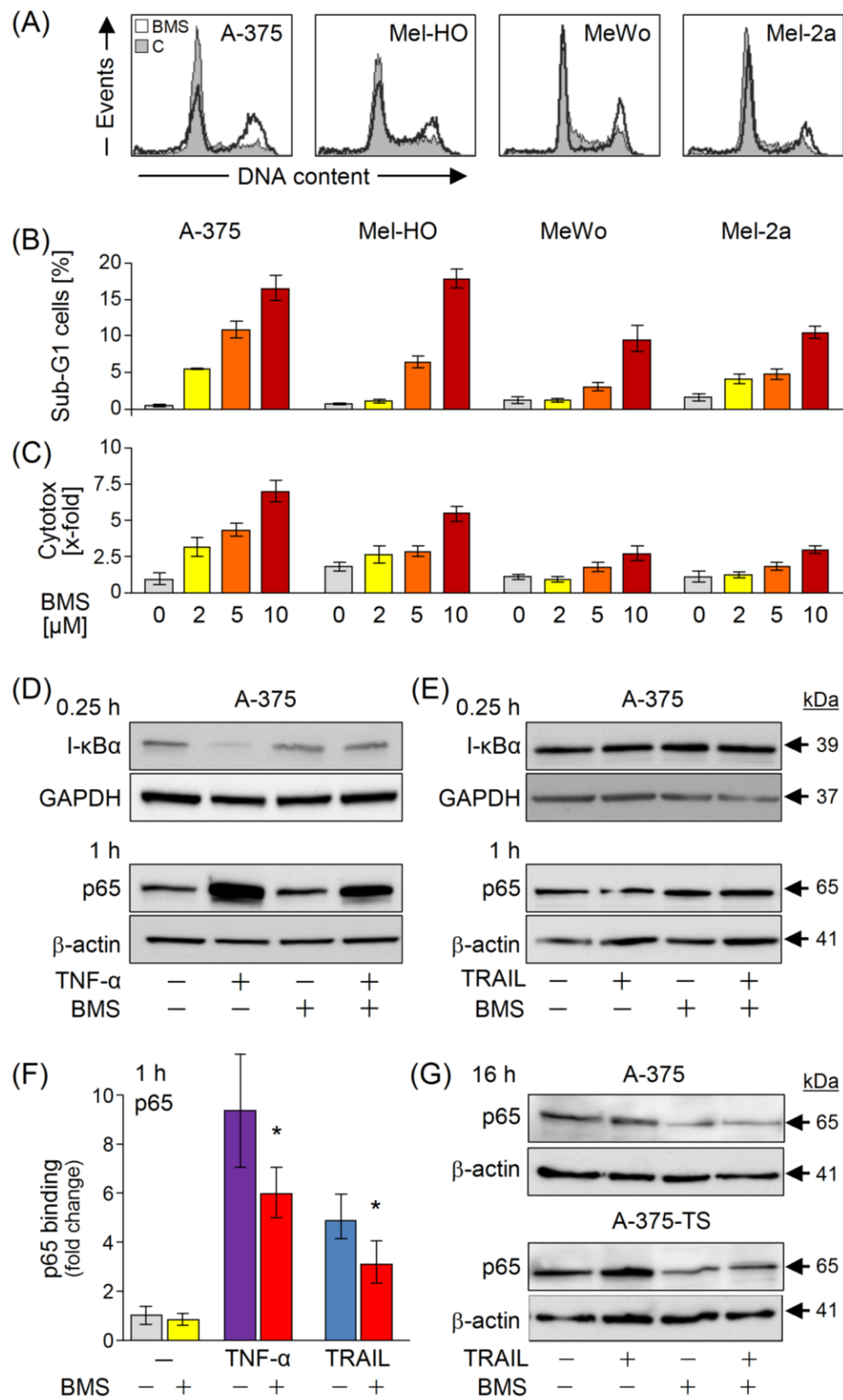


Abb. 24 Abbildungslegende nächste Seite

Abb. 24 Antiproliferativer Effekt von BMS-345541

(A) Die Zellzyklusanalyse wurde mittels PI-Färbung durch Durchflusszytometrie für A-375, Mel-HO, MeWo und Mel-2a nach der Behandlung (24 h) mit BMS-345541 (5 μ M, offene Graphen) durchgeführt. Als Kontrolle dienen DMSO-behandelte Zellen (gefüllte Graphen). Die Anzahl der Zellen in G1- und G2-Phase (%) sind innerhalb der Diagramme dargestellt.

(B) Die Apoptoseinduktion (% der Sub-G1-Zellfraktion) und (C) die Zytotoxizität (LDH-Freisetzung) ist in ansteigender Konzentration von BMS-345541 gezeigt. (A-C) Die Experimente wurden mindestens zweimal durchgeführt und zeigten vergleichbare Ergebnisse.

(D) Die Gesamtproteinextrakte von I- κ B α und der Kerngehalt an p65 wurden mittels Westernblot nach der Behandlung von TNF- α und/oder BMS-345541 (2 μ M) dargestellt. Die Gesamtproteinextrakte wurden nach 15 min und die Kernextrakte nach 60 min der Behandlung isoliert und anschließend analysiert.

(E) Die Gesamtprotein- und die Kernextrakte wurden zum gleichen Zeitpunkt geerntet. Die Zellen wurden mit TRAIL und/oder BMS-345541 (2 μ M) behandelt.

(F) Die relative p65 DNA-Bindungskapazität in den Kernextrakten von A-375-Zellen, welche für 1 h mit TNF- α , TRAIL und/oder BMS-345541 (2 μ M) behandelt wurden, wurde mittels ELISA quantifiziert. (B, C, F) Die Balken stellen Mittelwerte \pm SD von drei unabhängigen Experimenten dar, von denen jedes Experiment aus Dreifachwerten bestand. Die Signifikanz wurde bei einem p-Wert von $< 0,05$ mit [*] gekennzeichnet.

(G) Westernblots von Kernextrakten für die p65-Analyse in A-375 und A-375-TS nach 16 h der Behandlung mit TRAIL (20 ng/ml) und/oder BMS-345541 (A-375, 2 μ M; A-375-TS, 5 μ M). (D, E, G) Die Experimente wurden mindestens zweimal durchgeführt und zeigten vergleichbare Ergebnisse. Eine gleiche Proteinladung wurde mittels Ponceau-Färbung, β -Actin und GAPDH-Expression bestätigt.

2.3.2 Sensitivierung für die Todesliganden-induzierte Apoptose mittels BMS-345541

Die Kombinationen von BMS-345541 und TRAIL wurde in TRAIL-sensitiven (A-375, Mel-HO), permanent TRAIL-resistenten (MeWo, Mel-2a) und in TRAIL-selektierten Melanomzelllinien mit induzierter Resistenz untersucht (A-375-TS, Mel-HO-TS). Wohingegen nur moderate direkte proapoptotische Effekte mit geringeren Dosen an BMS-345541 (2-5 μ M) oder TRAIL gesehen wurden, ereignete sich eine starke Apoptoseinduktion in der Kombination. Apoptotische Zellen konnten mittels Zellzyklusanalyse als Zellen mit fragmentierter DNA identifiziert werden (Sub-G1-Zellpopulation; Abb. 25B). So konnten 35-40% apoptotische Zellen in den sensitiven A-375 und Mel-HO 24 h nach Behandlung und 15-25% Apoptose in den vorher resistenten Melanomzelllinien beobachtet werden (Abb. 25A). Eine ähnliche Verstärkung der Apoptose ($> 40\%$ bei 24 h) konnte in A-375 und Mel-HO gezeigt werden, als BMS-345541 (5 μ M) mit einem agonistischen CD95-Antikörper kombiniert wurden (CH-11; Abb. 25C).

Typische Charakteristika der Apoptose die nukleäre Fragmentierung und die Chromatinkondensation und vergleichbare Apoptoseraten (20-40%, bei 24 h) wurden mittels Bisbenzimid-Färbung in A-375 und A-375-TS sichtbar (Abb. 25D und E). Die induzierte Apoptose übte auch einen starken Einfluss auf die Zellproliferation aus, welche mit Echt-Zeit-Zell-Analyse überwacht wurde. So korrespondierte der Zellindex mit einem Verlust der Zellzahl um ein 3-7-faches 72 h nach Kombinationsbehandlung (Abb. 25F).

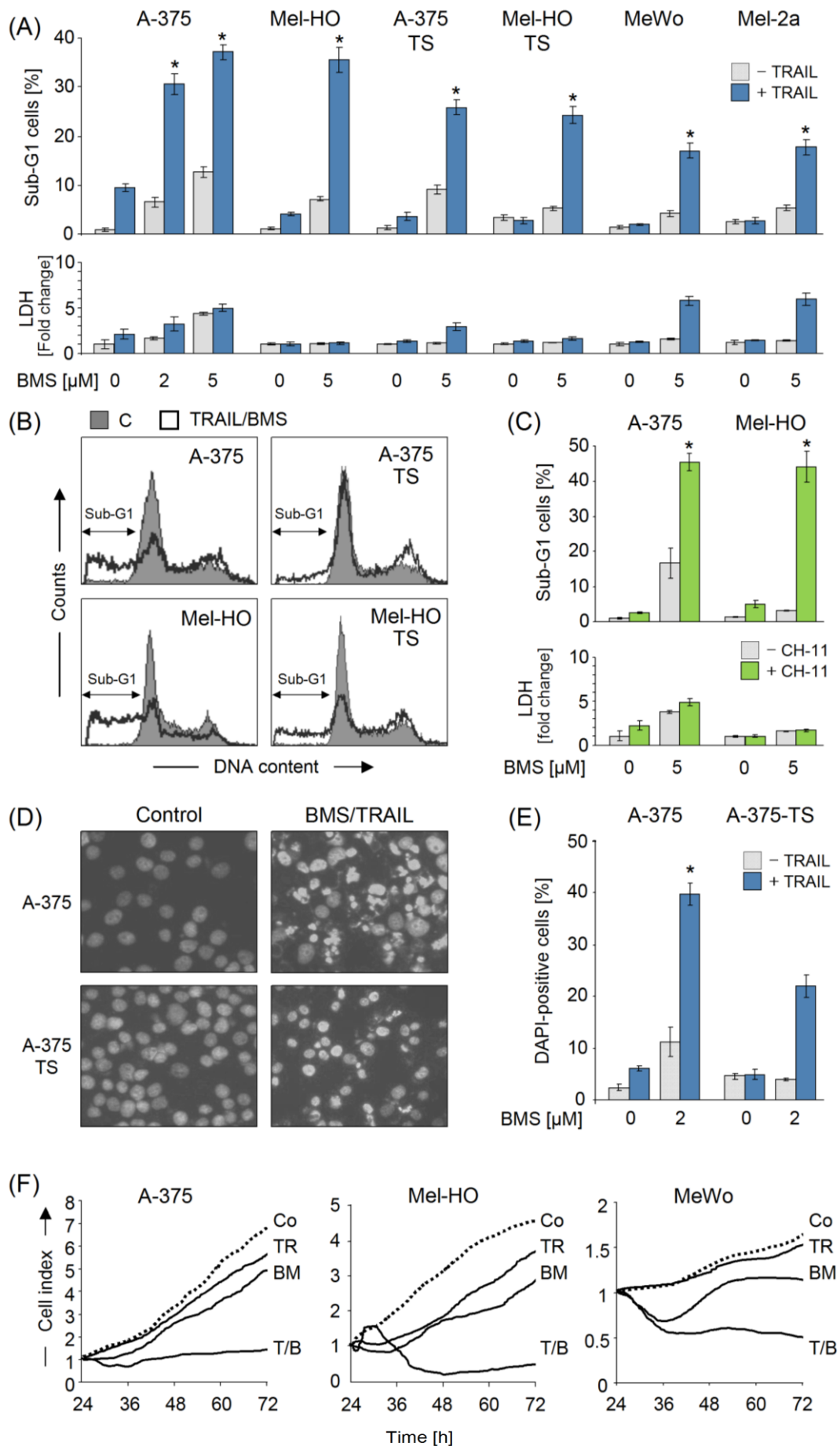


Abb.25 Abbildungslegende nächste Seite

Abb. 25 Sensitivierung von Melanomzelllinien für Todesliganden-induzierte Apoptose

(A) Die Apoptoserate (Sub-G1-Zellpopulationen in %) und die Zytotoxizität (LDH-Freisetzung) wurden in Melanomzelllinien auf ihr Ansprechen auf die Behandlung mit 2-5 μ M BMS-345541 +/- TRAIL untersucht.

(B) Gezeigt sind Beispiele von der Zellzyklusanalyse. BMS-345541/TRAIL-behandelte Zellen (offene Graphen) wurden verglichen mit den DMSO-behandelten Kontrollen (gefüllte Graphen).

(C) Die Apoptoserate (Sub-G1-Zellpopulationen in %) und die Zytotoxizität (LDH-Freisetzung) wurden in Mel-HO und A-375 auf ihr Ansprechen auf die Behandlung mit BMS (5 μ M) +/- CH-11 untersucht.

(D) Mikroskopische Abbildungen der Bisbenzimid-gefärbten A-375 und A-375-TS-Zellen und die Quantifizierung der Zellen mit fragmentiertem Kern oder kondensiertem Chromatin (E), 24 h nach Behandlung mit BMS-345541/TRAIL sind gezeigt. (A, C, E) Die Balken stellen Mittelwerte +/- SD von einem von mindestens zwei unabhängigen Experimenten dar, von denen jedes Experiment aus Dreifachwerten bestand. Die unabhängigen Experimente lieferten vergleichbare Ergebnisse. Die Signifikanz wurde bei einem p-Wert von $< 0,05$ mit [*] gekennzeichnet. Hierfür wurden die Zellen, welche mit der Kombination behandelt wurden, mit denen, die mit BMS-345541 allein behandelt wurden, verglichen.

(F) Die in der RTCA erhaltenen Wachstumskurven von Melanomzelllinien, welche mit TRAIL (TR; 20 ng/ml), BMS-345541 (BM; 2 μ M) oder der Kombination (T/B) behandelt wurden, wurden mit Kontrollzellen (Co) verglichen. Die Zelldichte bei der Aussaat betrug 1250 Zellen pro Mikrotiter-Well. Die Behandlung fand nach 24 h statt und der anschließende Messzeitraum betrug 72 h. Der festgestellte Zellindex gibt eine relative Messung der Zellzahl an. Die Experimente wurden zweimal mit jeweils Dreifachwerten durchgeführt und lieferten hohe vergleichbare Ergebnisse.

2.3.3 Involvierung der Caspasen in der Kombination von BMS-345541 mit TRAIL

In A-375 war die extrinsische Caspasenkaskade, wie bereits auch unter 2.2.3 erwähnt, durch TRAIL nach 16 h aktiviert. Dies wurde durch den Nachweis der Spaltprodukte von Caspase-8 (18, 41, 43 kDa) und Caspase-3 (15, 17, 20 kDa) als auch dem Verlust der Proformen dieser Caspasen (57, 35 kDa) deutlich. Die Degradation der Proformen Bid und Caspase-9 (22, 47 kDa) deutete weiter auf die Aktivierung des mitochondrialen Signalweges hin (Abb. 26A). Die nur moderate Apoptoseinduktion (10%; Abb. 26A) war trotz der Caspasenaktivierung vielsagend für die Caspaseninhibierung durch die cIAPs. Die Kombinationen mit BMS-345541 blieben ohne Effekt auf die Caspase-8 und Bid. Dessen ungeachtet wurde die Prozessierung von Caspase-9 und -3 signifikant verstärkt, was auf die Aktivierung des mitochondrialen Signalweges und die Überwindung der Blockade von Caspase-3 hinweist (Abb. 26A).

Auch hier konnte in A-375-TS nach 16 h in Ansprechen auf TRAIL eine Prozessierung von Caspase-8 trotz der fehlenden Apoptose beobachtet werden. Wie auch in 2.2.3 gesehen war die Prozessierung von Caspase-3 bei seinem intermediären Spaltprodukt (20 kDa) arretiert. Zusätzlich fehlte die Prozessierung von Caspase-9 und Bid, was auf eine Unterbrechung des mitochondrialen Signalweges als auch einer Inhibierung der Caspase-3 hindeutet (Abb. 26A). Die Blockierung konnte mittels der Kombinationsbehandlung

überwunden und eine effiziente Prozessierung von Bid, Caspase-9 und Caspase-3 konnte beobachtet werden, wohingegen die Behandlung mit BMS-345541 ohne Effekt blieb (Abb. 25A). Die entscheidende Rolle der Apoptoseinduktion konnte mittels des Pancaspase-Inhibitors zVAD-fmk dargestellt werden, welcher die Apoptose in der Kombination BMS-345541/TRAIL aufhob, wohingegen der proapoptotische Effekt von BMS-345541 nicht beeinflusst wurde (Abb. 26B).

Um die Funktion der Regulatoren der Apoptose zu untersuchen, wurde die Expression von antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen (Bcl-2, Mcl-1), proapoptotischen Bcl-2-Proteinen (Bax, Bak) und cIAPs (XIAP, Survivin) mittels Westernblot-Analyse in A-375 und A-375-TS 8 h und 16 h nach Behandlung untersucht. Während keine signifikanten Unterschiede für Bax, Bak, Bcl-2 und Survivin beobachtet werden konnte, wurde eine Herunterregulation von Mcl-1 und XIAP 16 h nach Kombinationsbehandlung sichtbar. Dies scheint als ein sekundärer Effekt aufzutreten, der nicht bei 8 h beobachtet und mittels des Caspaseinhibitors zVAD-fmk aufgehoben werden konnte (Abb. 26C). Beide Proteine schienen jeweils eine Zielstruktur der Caspasen als Folge der Apoptose zu sein.

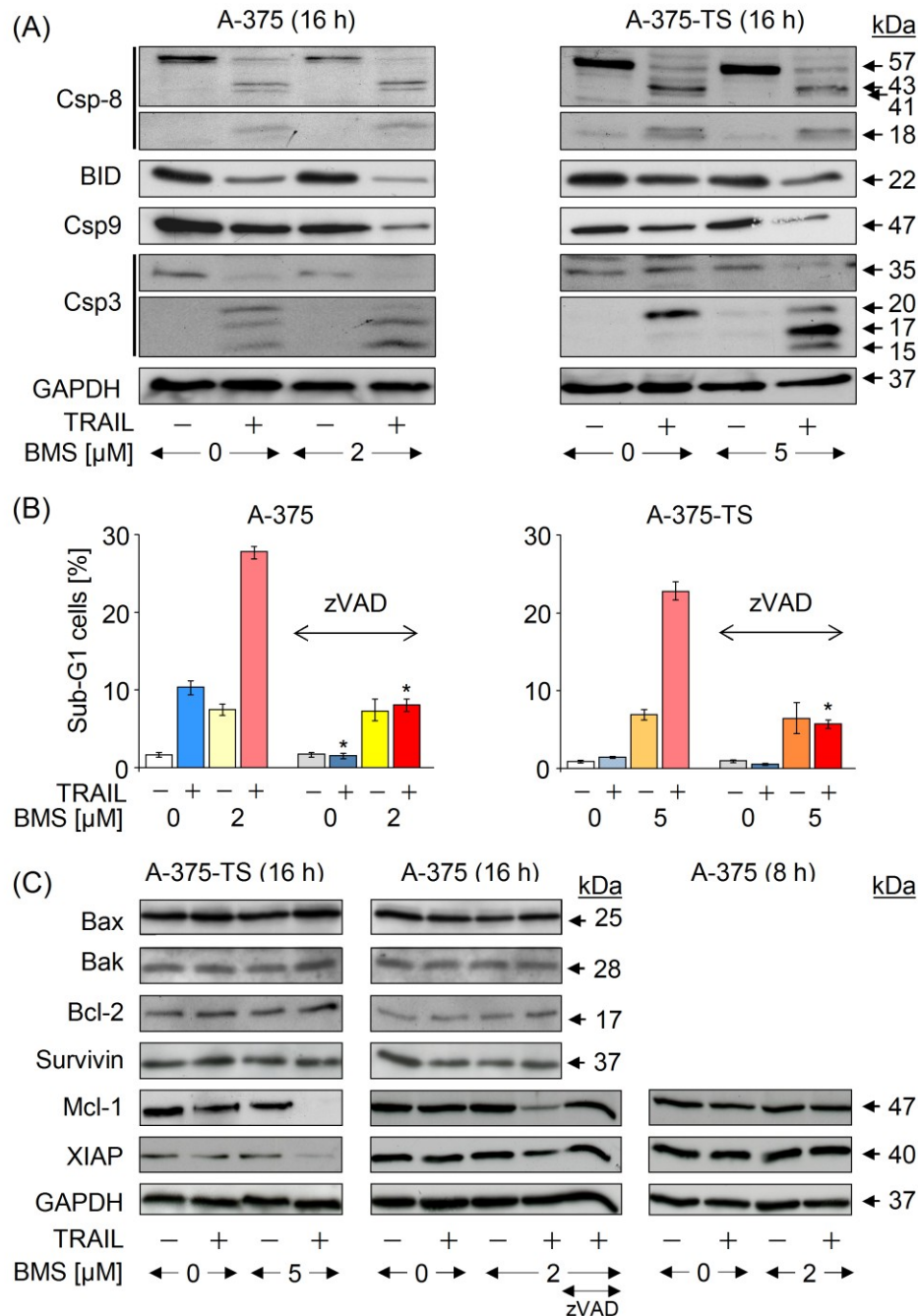


Abb. 26 Caspasen-Aktivierung durch BMS-345541 und TRAIL

A) Die Prozessierung von Caspase-8, -9 und -3 als auch von Bid wurde mittels Westernblot in A-375 und A-375-TS nach der Behandlung mit TRAIL +/- BMS (A-375, 2 μ M; A-375-TS, 5 μ M; 16 h) untersucht.

B) A-375 und A-375-TS wurden zusätzlich zu TRAIL +/- BMS-345541 mit zVAD-fmk (10 μ M, 1 h Vorbehandlung) behandelt. Die Apoptose (Sub-G1-Zellpopulationen in %) wurde nach 24 h ermittelt. Mittelwerte +/- SD von einem von zwei unabhängigen Experimenten, von denen jedes Experiment aus Dreifachwerten bestand, sind dargestellt. Beide Experimente zeigten ähnliche Ergebnisse. Die signifikante Inhibierung der Apoptose durch zVAD-fmk wurde bei einem p -Wert von $< 0,05$ mit [*] gekennzeichnet.

C) Die Expression von Apoptoseregulatoren wurde mittels Westernblot in A-375 und A-375-TS in Ansprechen auf TRAIL +/- BMS nach 8 und 16 h der Behandlung ermittelt. (A, B, C) Die Experimente wurden mindestens zweimal durchgeführt und zeigten vergleichbare Ergebnisse.

2.3.4 Entscheidende Rolle von Bcl-2 und Bax bei der TRAIL-induzierten Apoptose mittels BMS-345441

Ein deutlicher Hinweis auf die Aktivierung des intrinsischen Apoptosesignalweg ist ein starker Verlust des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\psi_m$ ($> 90\%$), welcher 24 h nach Behandlung von BMS-345441/TRAIL in A-375 und in A-375-TS gesehen werden konnte. Im Gegensatz dazu hatte BMS-345441 allein keinen Effekt auf $\Delta\psi_m$. Ein Effekt von TRAIL auf $\Delta\psi_m$ konnte in 18% der A-375-Zellen beobachtet werden. In der Analyse der Zeitkinetik zeigte sich der Verlust von $\Delta\psi_m$ nach Kombinationsbehandlung als einen frühen Schritt auf (2 h), bevor Apoptose nachweisbar war (Abb. 27A). Die quantitative Bewertung ermittelte eine initiale Phase (2-4 h), als der Verlust von $\Delta\psi_m$ in 20% der Zellen nachzuweisen war, aber keine Apoptose beobachtet werden konnte, und eine Amplifikationsphase (8-24 h), als die Apoptose parallel mit einem weiteren Verlust an $\Delta\psi_m$ anstieg (Abb. 27B).

Die entscheidende Rolle des mitochondrialen Signalweges wurde durch die Überexpression von Bcl-2 in A-375 (A375-Bcl-2) bestätigt, welche komplett die Apoptoseinduktion durch BMS-345441/TRAIL verhindern konnte (Abb. 27C). Dieser Effekt war mit einem kompletten Rückgang des Verlustes von $\Delta\psi_m$ sowohl in der initialen Phase (2 h) als auch der Amplifikationsphase (24 h) verbunden (Abb. 27D).

Bax- und Bak-vermittelte Signalwege wurden mittels eines HCT-116-Zellmodells untersucht. Dieses Model beinhaltet HCT-116 Kolonkarzinomzellen (Bax^+/Bak^+) sowie Subzelllinien mit einem Bax-Knockout- oder Bak-Knockdown- als auch Doppelknockdown-Zellen Bax^-/Bak^- . Eine effiziente Apoptoseinduktion konnte 24 h nach TRAIL/BMS-345441 in den parental HCT-116 und Bak- Knockdown-Zellen beobachtet werden. Jedoch war die Apoptose in den Bax-Knockout-Zellen vollständig blockiert (Abb. 27E) und der Verlust an $\Delta\psi_m$ stark vermindert (Abb. 27F).

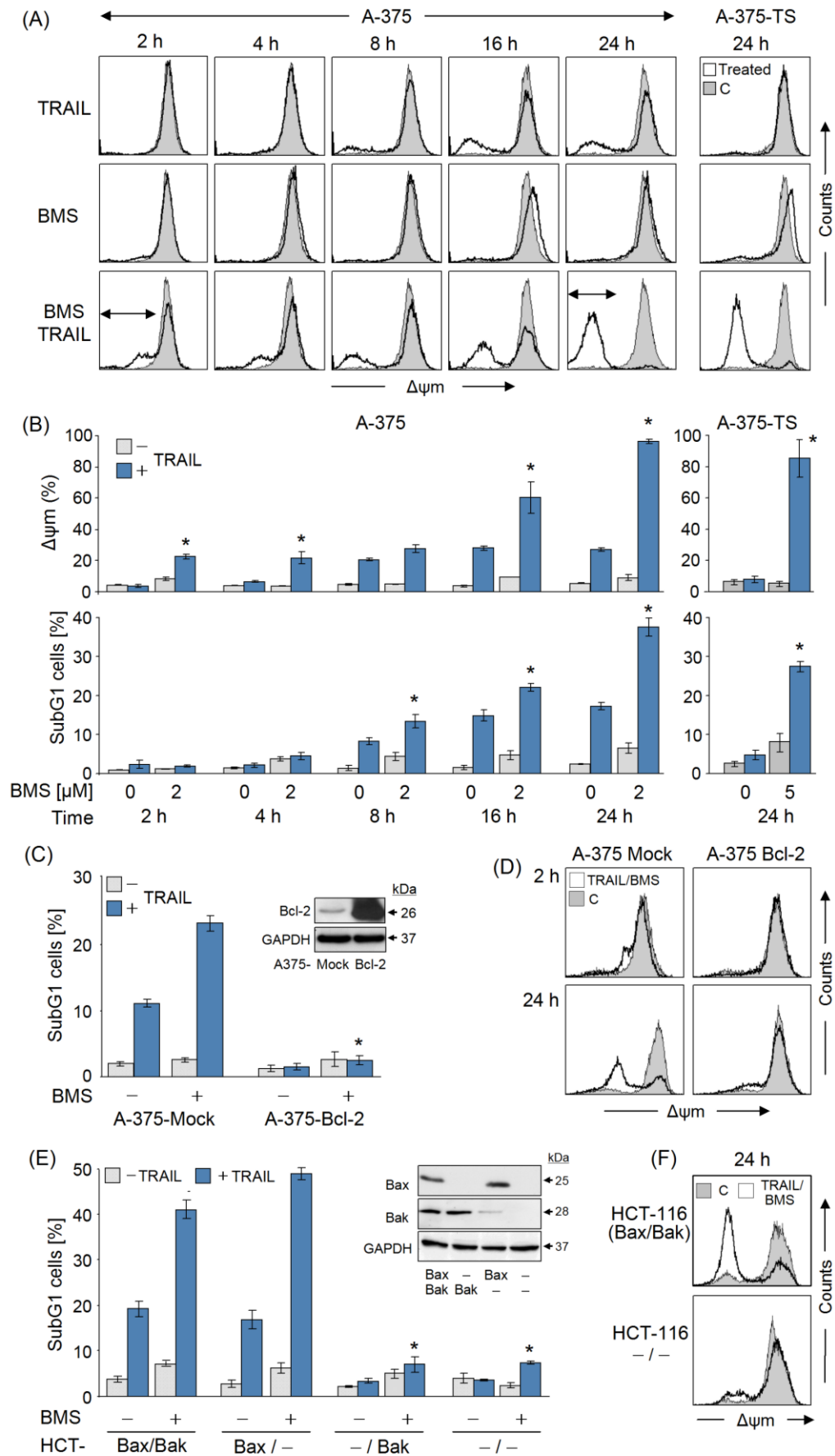


Abb. 27 Abbildungslegende nächste Seite

Abb.27 Reaktion der Mitochondrien auf BMS-345541

(A) Der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\psi_m$) ist in einer Analyse der Zeitkinetik für A-375 (2 bis 24 h), mit TRAIL und/oder BMS-345541 (2 μ M) behandelt, dargestellt. Zusätzlich wurde $\Delta\psi_m$ für A-375-TS nach 24 h Behandlung ermittelt (5 μ M BMS-345541; rechte Graphik). Die behandelten Zellen (offene Graphen) wurden mit den DMSO-behandelten Kontrollen (grau) verglichen. Zwei unabhängige Experimente zeigten vergleichbare Ergebnisse.

(B) In der quantitativen Analyse wurden die Zellen mit geringem $\Delta\psi_m$ (oben) mit den Zellen mit fragmentierter DNA (unten) verglichen. Mittelwerte \pm SD von einem repräsentativen von zwei unabhängigen Experimenten sind dargestellt. Jedes Experiment bestand aus Dreifachwerten (*; $p < 0,05$).

(C, E) Die Apoptose, mittels BMS-345541/TRAIL induziert, wurde in A-375, stabil transfiziert mit einem Bcl-2-Überexpressions-Konstrukt (A-375-Bcl-2) und als Kontrolle, stabil transfiziert mit einem Mock-Konstrukt in (C) untersucht. Zusätzlich wurde die Apoptoserate in Subklonen von HCT-116 (Bax⁺/Bak⁺) mit einem Knockdown für Bax und/oder Bak ermittelt (E). Die Expression von Bcl-2, Bax und Bak wurde mittels Westernblot (Einschübe, GAPDH als Ladekontrolle) bestimmt. Die statistisch signifikanten Unterschiede der parentalen Zellen und Mock-Kontrollen sind dargestellt (*; $p < 0,05$).

(D, F) $\Delta\psi_m$ ist in Ansprechen auf die BMS-345541 (5 μ M)/TRAIL Behandlung für die untersuchten Zellklone dargestellt. Die behandelten Zellen (offene Graphen) wurden mit den DMSO-behandelten Kontrollen (grau) verglichen. Jedes der zwei unabhängigen Experimente wurde mit Dreifachwerten durchgeführt und zeigten vergleichbare Ergebnisse.

2.3.5 Kritische Rolle von Smac und Bid bei der TRAIL-induzierten Apoptose mittels BMS-345541

Die starke Freisetzung der mitochondrialen Faktoren Cytochrom C, AIF und Smac konnte in A-375 und A-375-TS bereits 2 h nach Kombinationsbehandlung, bevor Apoptose induziert wurde, beobachtet werden (Abb. 28A). Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die mitochondriale Antwort initial in der BMS-345441/TRAIL-induzierten Apoptose ist.

Aufgrund der limitierenden Rolle der cIAPs repräsentiert Smac einen geeigneten Kandidaten für die Überwindung dieser Limitierung. In der Tat verminderte ein siRNA-vermittelter Smac-Knockdown die Apoptose durch BMS-345441/TRAIL in A-375 und in A-375-TS auf die Level, die von BMS-345441 selber resultieren (Abb. 28B). Der Smac-Knockdown konnte ebenfalls den Verlust von $\Delta\psi_m$ in der Amplifikationsphase aufheben (24 h), aber blieb ohne Effekt bei dem frühen Verlust von $\Delta\psi_m$ (2 h) im Vergleich zur Scramble-siRNA Transfektion (Abb. 28C).

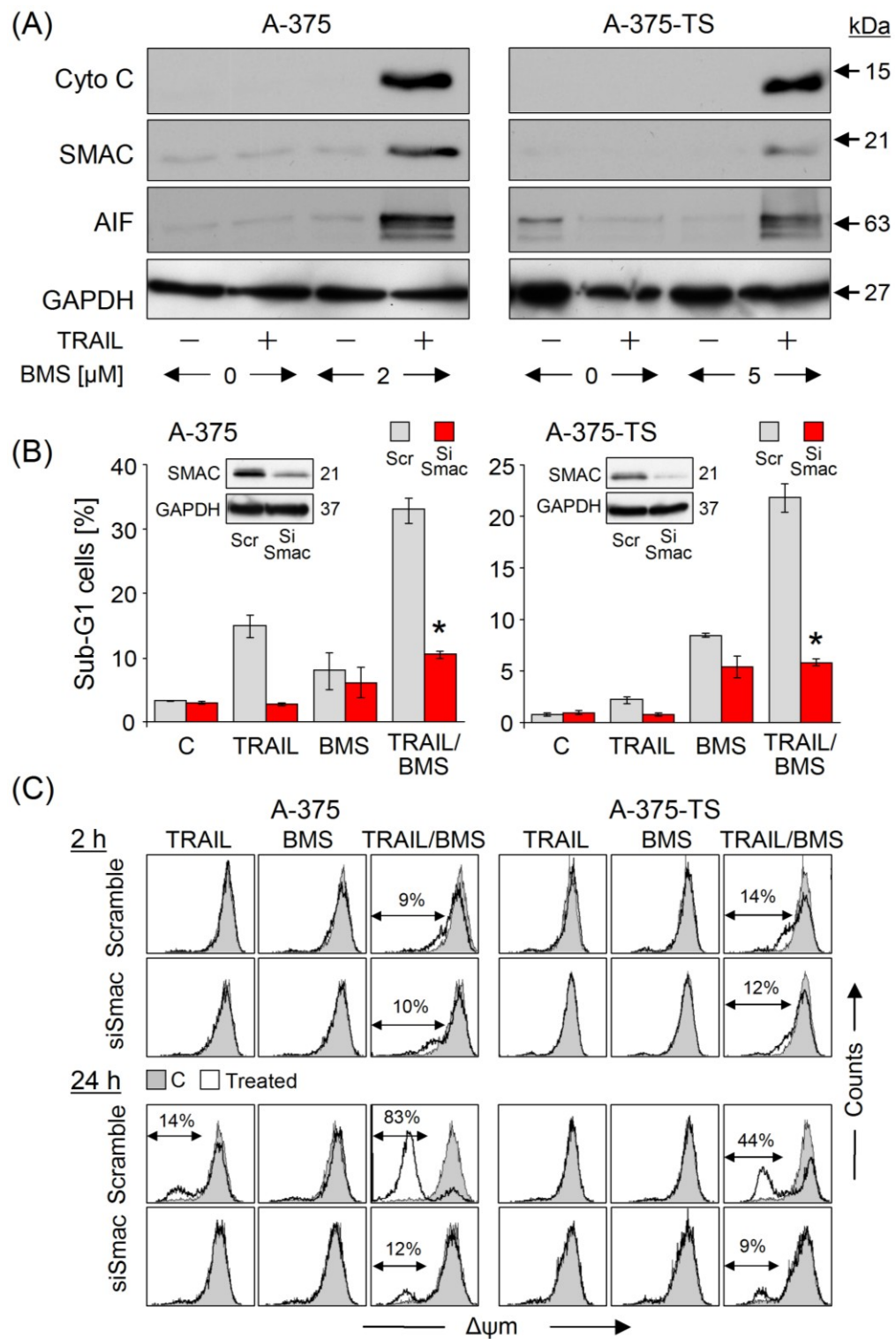


Abb. 28 Abbildungslegende nächste Seite

Abb. 28 Rolle des mitochondrialen Apoptosesignalweges und Smac

(A) Zytosolische Extrakte von A-375 und A-375-TS wurden nach der Behandlung für 2 h mit TRAIL +/- BMS-345541 (A-375, 2 μ M; A-375-TS, 5 μ M) isoliert, bevor diese mittels Westernblot analysiert wurden. Eine gleiche Proteinladung wurde mittels Ponceau-Färbung und dem zytosolischen Protein GAPDH bestätigt. Zwei unabhängige Experimente zeigten vergleichbare Ergebnisse.

(B) Die Sensitivität von A-375 und A-375-TS für die BMS-345541/TRAIL-induzierte Apoptose (Sub-G1-Zellpopulationen in %, 24 h Behandlung) ist nach dem siRNA vermitteltem Knockdown von Smac (rote Balken) gezeigt. Diese Werte sind im Vergleich zu den parallel behandelten Scramble-siRNA transfizierten Kontrollen dargestellt (hellgraue Balken). Die Herunterregulation von Smac ist in den Einschüben gezeigt (Westernblot, GAPDH als Kontrolle). Mittelwerte +/- SD sind von einem repräsentativen von zwei unabhängigen Experimenten dargestellt, von denen jedes Experiment aus Dreifachwerten bestand (*; $p < 0,05$). Hierfür wurden die Zellen, welche mit der siRNA gegen Smac behandelt wurden, mit denen, die mit der Scramble-siRNA behandelt wurden, verglichen.

(C) $\Delta\psi_m$ wurde in A-375- und A-375-TS-Zellen ermittelt, nachdem diese für 2 h oder 24 h mit TRAIL +/- BMS-345541 (A-375, 2 μ M; A-375-TS, 5 μ M) behandelt wurden. Die behandelten Zellen (offene Graphen) wurden mit den DMSO-behandelten Kontrollen (graue Graphen) verglichen. Zwei unabhängige Experimente zeigten vergleichbare Ergebnisse.

Die Caspase-8-vermittelte Prozessierung von Bid zu tBid repräsentiert den einen Weg, um den Todesrezeptor-vermittelten Signalweg mit dem mitochondrialen Apoptosesignalweg zu verbinden. Folglich haben wir die Funktion von Bid in der BMS-345441/TRAIL-induzierten Apoptose mittels siRNA-vermitteltem Bid-Knockdown überprüft. Erneut konnte die Apoptose durch BMS-345441/TRAIL in A-375 und A-375-TS auf den Level der Behandlung mit BMS-345541 allein reduziert werden (Abb. 29A). Hier konnte der Verlust von $\Delta\psi_m$ sowohl in der initialen Phase (2 h) als auch der Amplifikationsphase (24 h) vollständig aufgehoben werden (Abb. 29B). Folglich stellt die Funktion von Bid einen frühen regulatorischen Schritt in der TRAIL/BMS-345441-vermittelten Apoptose dar.

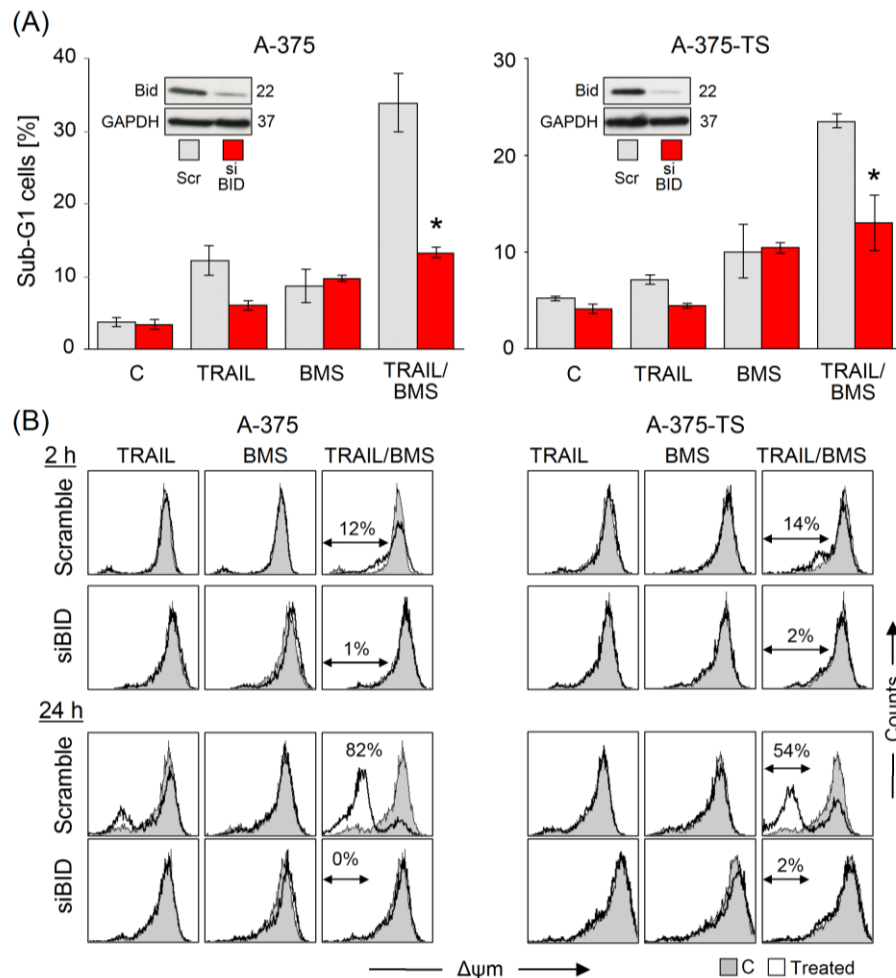


Abb. 29 Abhängigkeit von Bid

(A) Die Sensitivität von A-375 und A-375-TS für die BMS-345541/TRAIL-induzierte Apoptose (Sub-G1-Zellpopulationen in %, 24 h Behandlung) ist nach dem siRNA vermitteltem Knockdown von Bid (rote Balken) gezeigt. Diese Werte sind im Vergleich zu den parallel behandelten Scramble-siRNA transfizierten Kontrollen dargestellt (hellgraue Balken). Die Herunterregulation von Bid ist in den Einschüben gezeigt (Westernblot, GAPDH als Kontrolle). Mittelwerte \pm SD von einem repräsentativen von zwei unabhängigen Experimenten sind dargestellt, von denen jedes Experiment aus Dreifachwerten bestand (*; $p < 0,05$). Hierfür wurden die Zellen, welche mit der siRNA gegen Bid behandelt wurden, mit denen, die mit der Scramble-siRNA behandelt wurden, verglichen.

(B) $\Delta\psi_m$ wurde in A-375- und A-375-TS-Zellen ermittelt, nachdem diese für 2 h oder 24 h mit TRAIL +/- BMS-345541 (A-375, 2 μ M; A-375-TS, 5 μ M) behandelt wurden. Die behandelten Zellen (offene Graphen) wurden mit den DMSO-behandelten Kontrollen (graue Graphen) verglichen. Zwei unabhängige Experimente zeigten vergleichbare Ergebnisse.

2.3.6 Aktivierung von Bax mittels BMS-345541 durch Phosphorylierung

Die Untersuchung der kritischen Rolle von Bax erfolgte durch die Analyse der Bax-Aktivierung in Ansprechen auf moderate Konzentrationen von BMS-345541. Mit einem N-terminalen-spezifischen Antikörper konnte in A-375 und A-375-TS gezeigt werden, dass eine signifikante Bax-Aktivierung bereits 1 h nach Behandlung mit BMS-345541

allein nachweisbar war (Abb. 30A). Diese Aktivierung korrelierte mit einer mitochondrialen Translokation von Bax in A-375 und in A-375-TS nach 2 h (Abb. 30B). Aussagekräftig für die kooperativen Aktivitäten von Bid und Bax war eine Translokation von tBid an die Mitochondrien in Reaktion auf TRAIL-Behandlung. Somit wurden sowohl Bid als auch Bax in der Kombinationsbehandlung aktiviert (Abb. 30B).

Um die Verbindung zu verstehen, wie BMS-345541 eventuell die Aktivierung von Bax beeinflussen könnte, haben wir eine Nachweismethode entwickelt, der den Status der Phosphorylierung von Bax an den Stellen Serin-184 und Threonin-167 überwacht. Diese Nachweismethode basiert auf der Permeabilisierung von Zellen und dessen Färbung mittels eines Phosphorylierungs-spezifischen Antikörpers. Mit der anschließenden Durchflusszytometrie, zeigte sich eine signifikante Reduktion der deaktivierenden Bax-Phosphorylierung an Serin-184 und eine signifikante Verstärkung der aktivierenden Bax-Phosphorylierung an Threonin-167 in früher Reaktion 1 h nach Behandlung mit BMS-345541. Zur Kontrolle wurden Antikörper gegen das Bax (Gesamtprotein) verwendet, deren Signale nicht durch BMS-345541 verändert wurden (Abb. 30C). Um weiter die Spezifität dieser Nachweismethode zu überprüfen, wurden die Level an Bax, pBax (Ser184) und pBax (Thr176) auch in den parentalen HCT-116 und den Bax-Knockout-Zellen untersucht. Die unspezifische Bindung dieser Antikörper wurde ausgeschlossen, indem die parentalen HCT-116-Zellen eine signifikante Expression von Bax (Gesamtprotein) für alle drei Antikörper aufwiesen, wohingegen kein Signal in den Bax-Knockout-Zellen gesehen werden konnte (Abb. 30D). Folglich setzt diese Nachweismethode eine Verbindung zwischen einer BMS-345541-vermittelten Kinaseinhibition und einer Aktivierung von Bax.

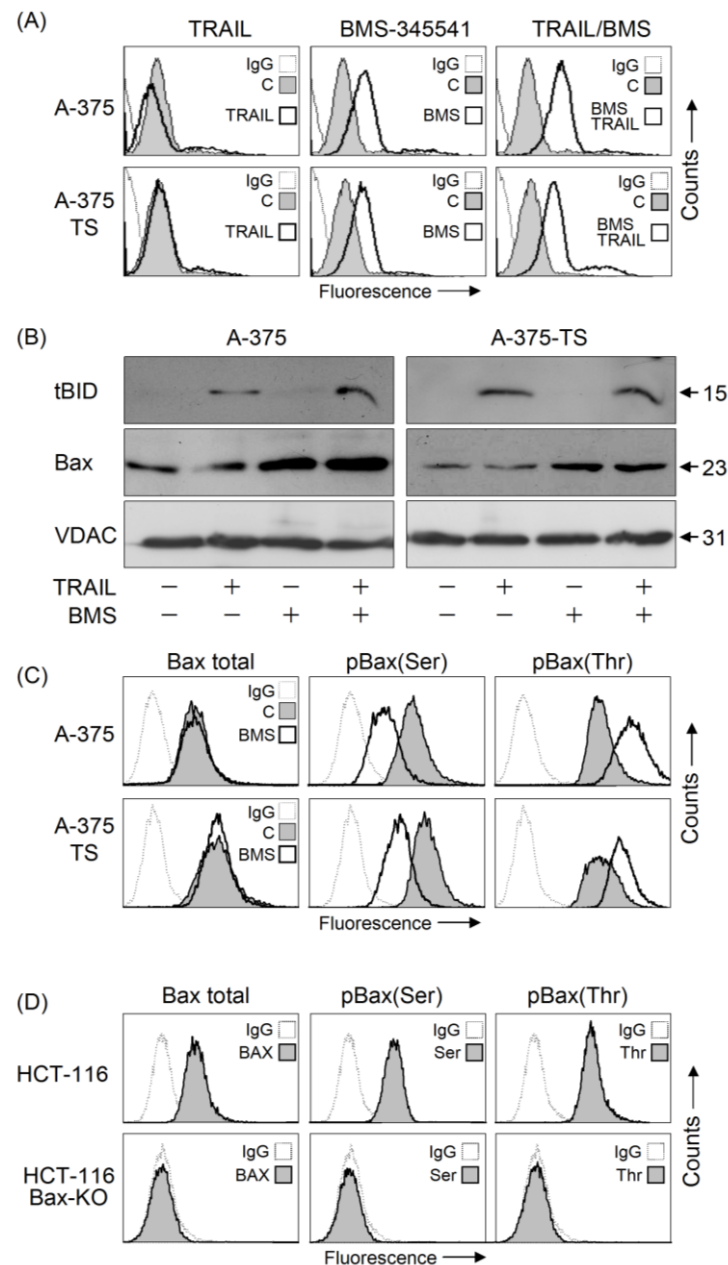


Abb. 30 Rolle von Bax

(A) A-375 und A-375-TS wurden für 1 h mit TRAIL +/- BMS-345541 (A-375, 2 μ M; A-375-TS, 5 μ M) behandelt und anschließend für die Konformationsänderungen von Bax mittels Durchflusszytometrie analysiert (Bax-NT Antikörper). Die behandelten Zellen (offene Graphen) sind im Vergleich zu den DMSO-behandelten Kontrollen (graue Graphen) dargestellt.

(B) Die mitochondrialen Extrakte von A-375 und A-375-TS, welche für 2 h mit TRAIL +/- BMS-345541 (A-375, 2 μ M; A-375-TS, 5 μ M) behandelt wurden, wurden mit Westernblot analysiert. Eine gleiche Proteinladung wurde mittels des mitochondrialen Proteins VDAC bestätigt.

(C) A-375 und A-375-TS wurden für 1 h mit BMS-345541 (A-375, 2 μ M; A-375-TS, 5 μ M) behandelt und anschließend für pBax (Ser167) und pBax (Thr184) mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die behandelten Zellen (offene Graphen) sind im Vergleich zu den DMSO-behandelten Kontrollen (graue Graphen) dargestellt.

(D) Die basale Expression von Bax, pBax (Ser167) und pBax (Thr184) ist mittels Durchflusszytometrie in HCT-116 und HCT-116 Bax-KO dargestellt. (A, C, D) IgG1-gefärbte Zellen dienen als Kontrolle für die Durchflusszytometrie (grau gepunktet). Zwei unabhängige Experimente zeigten vergleichbare Ergebnisse.

Ein Model, welches die Sensitivierung von Melanomzellen für die TRAIL-induzierte Apoptose erklärt, ist hier dargestellt. Dementsprechend resultiert TRAIL in einer frühen Aktivierung von Caspase-8, aber die direkte Apoptoseinduktion durch Caspase-3 war durch die hohe Aktivität von cIAPs blockiert. Die BMS-345541-vermittelte Kinaseinhibition bewirkte eine veränderte Phosphorylierung von Bax, die eng in Verbindung mit der Aktivierung von Bax und deren mitochondrialen Translokation stand. Es zeigte sich auch, dass die Bax-induzierte Apoptose durch Bcl-2 geschützt. Eine effiziente Induktion der Apoptose war nur nach der Kombination mit beiden Wirkstoffen möglich. Letztendlich wirkte das von TRAIL aktivierte Bid deaktivierend auf Bcl-2, sodass der Signalweg für die Bax-induzierte Apoptose geöffnet wurde. Dies resultierte in der Freisetzung von proapoptotischen mitochondrialen Faktoren wie Smac, welches die Aktivität der cIAPs hemmt, sodass die Inhibition der Caspase-3 überwinden wurde (Abb. 31).

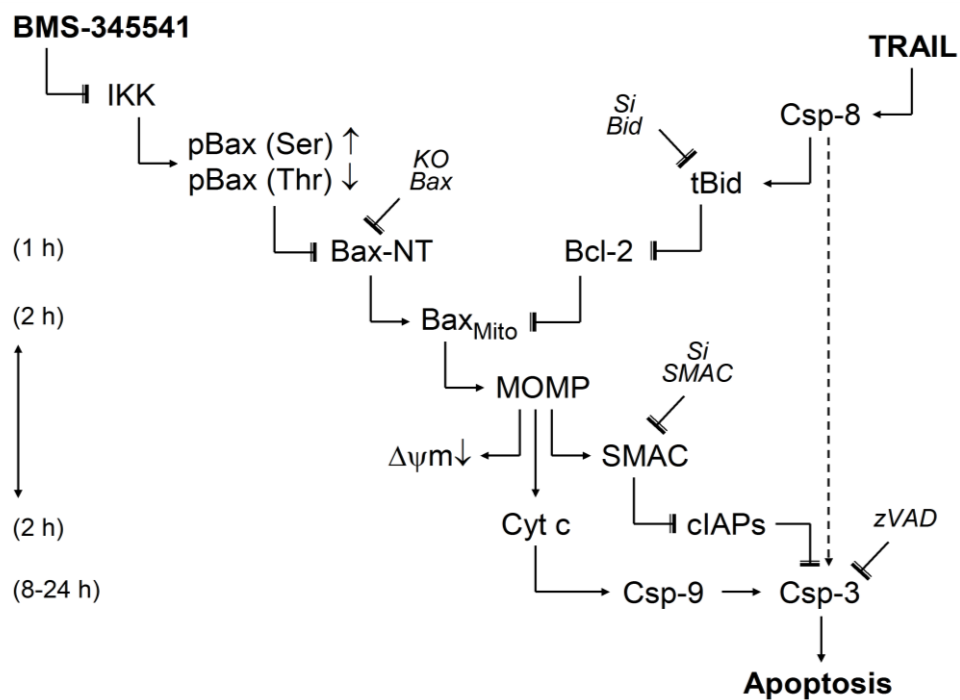


Abb. 31 Model der synergistischen Interaktion für die synergistische Interaktion von TRAIL und BMS-345541 wird präsentiert (nähere Erläuterungen im Text).

2.4 Sensitivierung für die TRAIL-induzierte Apoptose mittels des Kinaseinhibitor L-779,450

2.4.1 Die direkten Effekte von L-779,450

Um weitere Strategien zur Überwindung der Resistenz gegenüber der TRAIL-induzierten Apoptose von Melanomzellen zu identifizieren, wurde der pan-RAF-Inhibitor L-779,450 eingesetzt. Sein inhibitorischer Effekt auf den MAPK-Signalweg wurde in Melanomzellen durch die Beobachtung der Phosphorylierung von ERK nachgewiesen. Eine starke Herunterregulation von pERK konnte durch die Behandlung mit L-779,450 (5-10 μ M) in den zwei Zelllinien, A-375 und A-375-TS, im Vergleich zum Gesamt-ERK-Signal, beobachtet werden (Abb. 32A). Diese Inhibierung ging mit einem partiellen G1-Arrest und einem fast vollständigem Verlust der S-Phase einher, welcher 24 h nach Behandlung sowohl in drei BRAF-mutierten Melanomzelllinien, A-375, Mel-HO und Mel-2a, als auch mit deren TRAIL-resistenten Subzelllinien A-375-TS and Mel-HO-TS sichtbar wurde (Abb. 32B). Im Gegensatz dazu konnte dies nicht im Fall der BRAF-Wildtyp-Zelllinie MeWo beobachtet werden.

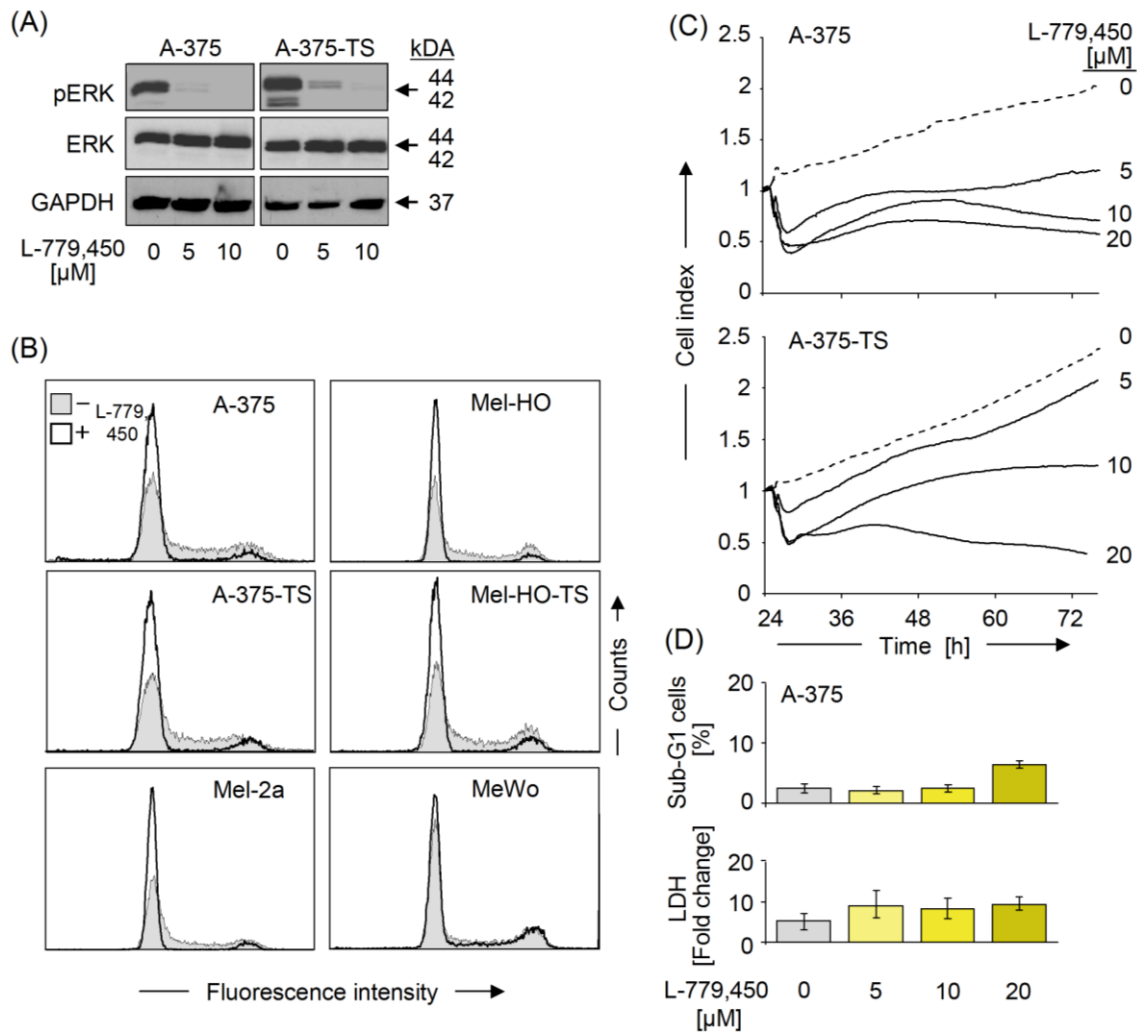


Abb. 32 Effekte von L779,450

(A) Die Proteine von A-375 und A-375-TS wurden nach 24 h Behandlung mit L-779,450 (5, 10 μ M) isoliert und mittels Westernblot auf die Expression von ERK und pERK analysiert. Gleiche Proteinladung (30 μ g/Bahn) sowie ein gleichmäßiger Proteintransfer wurden durch Ponceau-Färbung und GAPDH-Expression bestätigt. Das Molekulargewicht ist in kDa angegeben. Die Experimente wurden zweimal durchgeführt.

(B) Die Zellzyklusanalyse wurde mit PI-Färbung durch Durchflusszytometrie für sechs verschiedene Melanomzelllinien nach der Behandlung mit 10 μ M L-779,450 für 24 h (Vergleich zu Kontrollzellen) durchgeführt.

(C) Die Real-Zeit-Zell-Analyse (real-time cell analysis - RTCA) wurde mit A-375 und A-375-TS, behandelt mit 5, 10 und 20 μ M L-779,450, durchgeführt. Die Zelldichte bei der Aussaat betrug 1250 Zellen pro Mikrotiter-Well. Die Behandlung fand nach 24 h statt. Der festgestellte Zellindex gibt eine relative Messung der Zellzahl an.

(D) Oben: Die Apoptoserate ist in Prozent der Sub-G1-Zellpopulationen (%) angegeben. Diese Werte wurden mittels Durchflusszytometrie nach PI-Färbung ermittelt. Unten: Die Zytotoxizität wurde durch den Nachweis von LDH im Zellkulturüberstand bestimmt. Hierbei erfolgte die LDH-Messung parallel zur Bestimmung der Sub-G1-Zellpopulationen. Die LDH-Werte sind als Relativwerte zu verstehen ($c=1$). Die Zellen wurden, wie angegeben, mit unterschiedlichen Konzentrationen an L-779,450 (5, 10, 20 μ M) behandelt. Die Balken stellen Mittelwerte \pm SD von einem repräsentativen zweier unabhängiger Experimente dar. (B-D) Die Experimente wurden mindestens zweimal mit jeweils Dreifachwerten durchgeführt und lieferten hohe vergleichbare Ergebnisse.

Diese Effekte resultierten in einer starken und Dosis-abhängigen Abnahme der Zellproliferation in Reaktion auf L-779,450, wie es durch Echt-Zeit-Zell-Analyse von der Anzahl der angehefteten Zellen in A-375 und A-375-TS nachgewiesen wurde (Abb. 32C). Letztlich war die verminderte Zellzahl nicht mit einer signifikanten Induktion der Apoptose oder Zytotoxizität, wie es mittels Zellzyklusanalyse bzw. Freisetzung von LDH ermittelt wurde, verbunden (Abb. 32D).

2.4.2 Sensitivierung für die TRAIL-induzierte Apoptose mittels L-779,450

Die Kombinationen von L-779,450 und TRAIL wurden in TRAIL-sensitiven A-375, moderat sensitiven Mel-HO, permanent TRAIL-resistenten MeWo und Mel-2a, als auch in Melanomzelllinien, welche für TRAIL-Resistenz durch kontinuierliche Kultivierung mit TRAIL selektiert wurden (A-375-TS, Mel-HO-TS), durchgeführt. Trotz des moderaten Effektes auf die Apoptose durch L-779,450 allein, verstärkte L-779,450 die TRAIL-induzierte Apoptose in sensitiven Zelllinien und hob die TRAIL-Resistenz in A-375-TS, Mel-HO-TS und Mel-2a auf. Somit waren bei A-375 35% und bei Mel-HO 16% sowie in den vorher resistenten Mel-2a, A-375-TS und Mel-HO-TS 24 h apoptotische Zellen nach Kombinationsbehandlung nachweisbar. Im Gegensatz hierzu konnte L-779,450 nicht die BRAF-Wildtyp-Zelllinie MeWo für die TRAIL-induzierte Apoptose sensitivieren (Abb. 33A). Die Zytotoxizität war zu diesem Zeitpunkt in allen untersuchten Zelllinien fast vollständig unbeeinflusst (Abb. 33B).

Die nukleären morphologischen Charakteristika der Apoptose, wie nukleäre Fragmentierung und die Chromatinkondensation, wurden mittels Bisbenzimid-Färbung in A-375 und A-375-TS sichtbar gemacht (Abb. 33C). Die Zählung der positiv gefärbten Zellen wiesen vergleichbare Apoptoseraten mit dieser Technik auf. (18-30% bei 24 h, Abb. 33D). Die induzierte Apoptose hatte einen starken Einfluss auf die Zellproliferation, was durch Echt-Zeit-Zell-Analyse nachgewiesen wurde. Somit war sowohl die Zelladhäsion als auch Zellproliferation bereits 36 h nach Kombinationsbehandlung in A-375 und A-375-TS fast vollständig herunterreguliert (Abb. 33E).

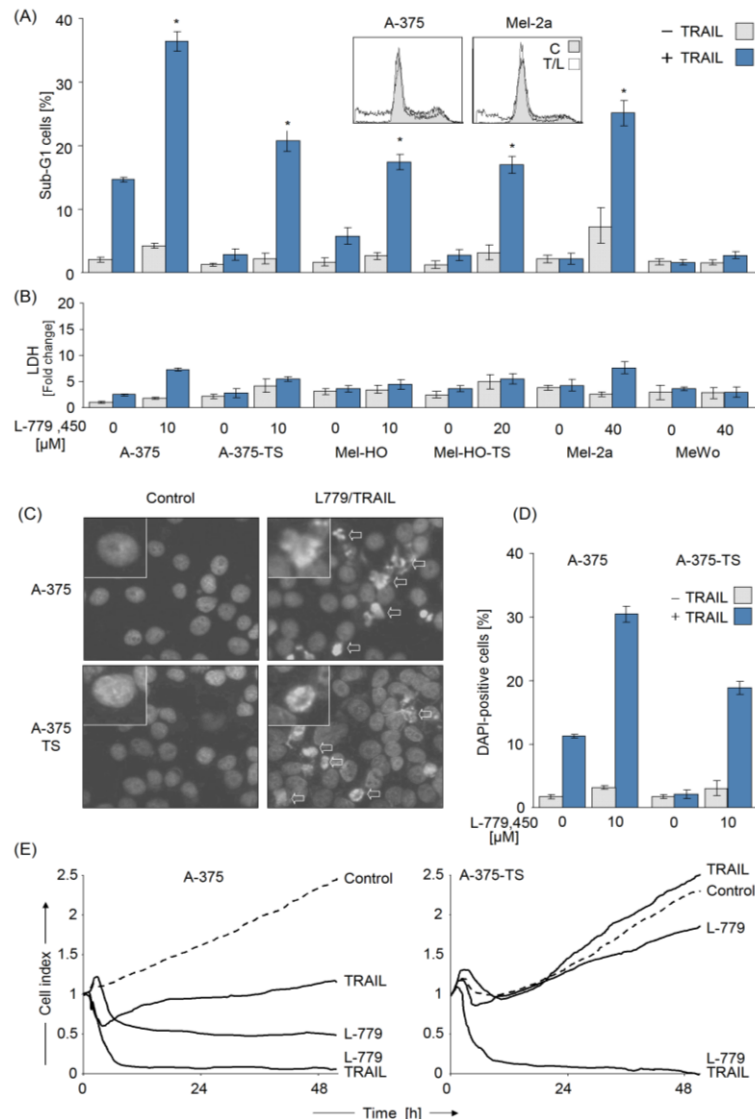


Abb. 33 Sensitivierung für Todesliganden-induzierte Apoptose mittels L-779,450

(A) Die Apoptoserate ist in Prozent der Sub-G1-Zellpopulationen (%) angegeben. Diese Werte wurden mittels Durchflusszytometrie nach PI-Färbung ermittelt. Die Zellen wurden, wie angegeben, mit L-779,450 (10 μ M) und/oder TRAIL (20 ng/ml) für 24 h behandelt.

(B) Die Zytotoxizität wurde durch den Nachweis von LDH im Zellkulturüberstand bestimmt. Hierbei erfolgte die LDH-Messung parallel zur Bestimmung der Sub-G1-Zellpopulationen. Die LDH-Werte sind als Relativwerte zu verstehen ($c=1$).

(C) Photographien der Bisbenzimid-gefärbten A-375 und A-375-TS-Zellen und die Quantifizierung der Zellen mit fragmentiertem Kern oder kondensiertem Chromatin (D), welche für 24 h mit L-779,450/TRAIL behandelt wurden, sind gezeigt. (A, B, D) Die Balken stellen Mittelwerte \pm SD eines von mindestens zwei unabhängigen Experimenten dar, von denen jedes Experiment aus Dreifachwerten bestand. Die unabhängigen Experimente lieferten vergleichbare Ergebnisse. Die Signifikanz wurde bei einem p-Wert von $< 0,05$ mit [*] gekennzeichnet. Hierfür wurden die Zellen, welche mit der Kombination behandelt wurden, mit denen, die mit L-779,450 allein behandelt wurden, verglichen.

(E) In der Real-Zeit-Zell-Analyse (RTCA) wurden A-375- und A-375-TS-Zellen mit L-779,450 (A-375, 5 μ M; A-375-TS, 5 μ M), 20 ng/ml TRAIL oder der Kombination behandelt und analysiert. Die Zelldichte bei der Aussaat betrug 1250 Zellen pro Mikrotiter-Well und wurde mit dem Zeitpunkt der Behandlung (24 h) normalisiert. Die Experimente wurden jeweils zweimal mit je Dreifachwerten durchgeführt und zeigten vergleichbare Ergebnisse.

2.4.3 Aktivierung des mitochondrialen proapoptotischen Signalweges in der L-779,450/TRAIL-vermittelten Apoptose

Die Beteiligung der Caspasen und Bid (die Verbindung zwischen Caspase-8 und den Mitochondrien), wurde durch die Beobachtung der aktivierten Spaltprodukte als auch der Abnahme der Proform untersucht. Die Prozessierung und Aktivierung der Initiatorcaspase-8 und von Bid konnte bereits in Ansprechen auf TRAIL (16 h) in A-375 und A-375-TS beobachtet werden, obwohl A-375-TS nicht auf die Behandlung von TRAIL anspricht. Dies wurde durch die Spaltprodukte (41, 43 kDa) und auch durch den Verlust der Proformen (57, 22 kDa) sichtbar. Jedoch wurde die Prozessierung nicht durch die Kombinationsbehandlung verstärkt, obwohl die Anzahl der apoptotischen Zellen zunahm. Ähnliches konnte für Caspase-9 gezeigt werden. Caspase-9 zeigte einen Verlust der 47 kDa großen Proform in A-375 im Zuge der Kombinationsbehandlung. Dies war aber nicht in A-375-TS der Fall. Folglich konnten die Analysen nicht vollständig die Verstärkung der Apoptose in der Kombination von L-779,450 und TRAIL erklären (Abb. 34A).

Dennoch war die Prozessierung von der Effektorcaspase-3 signifikant durch die Kombination verstärkt, was obwohl in den Spaltprodukten von 15, 17 und 20 kDa als auch dem Verlust der 35 kDa großen Proform gezeigt werden konnte (Abb. 34A). Die ausschlaggebende Rolle der Aktivierung der Caspase wurde durch den Pancaspase-Inhibitor Q-VD-OPh dargestellt, welcher in der Lage war, die Apoptose durch L-779,450 und TRAIL vollständig zu blockieren (Abb. 34B). Das Fehlen von der Verstärkung der Initiatorcaspasen kann auf die Rolle der cIAPs hinweisen, welche die Aktivierung der Caspase-3 blockieren können.

Ein Hinweis auf die Aktivierung des intrinsischen Signalweges war die starke Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\psi_m$, welche 24 h nach Behandlung mit L-779,450/TRAIL in A-375 (>90%) und in A-375-TS (50%) parallel mit der Apoptose auftrat. Im Gegensatz dazu hatte L-779,450 allein keinen Effekt auf $\Delta\psi_m$. Ein Ansprechen auf TRAIL war in nur 16% der Zellen von A-375 zu beobachten (Abb. 34C).

Letztendlich wurde die Aktivierung des mitochondrialen Signalweges auch durch die Freisetzung der proapoptotischen Faktoren Cytochrom C, AIF und Smac in A-375 und A-375-TS nachgewiesen (Abb. 34D). Die Freisetzung der Faktoren war bereits 3 h nach Kombinationsbehandlung zu beobachten bevor Apoptose aufgezeigt werden konnte.

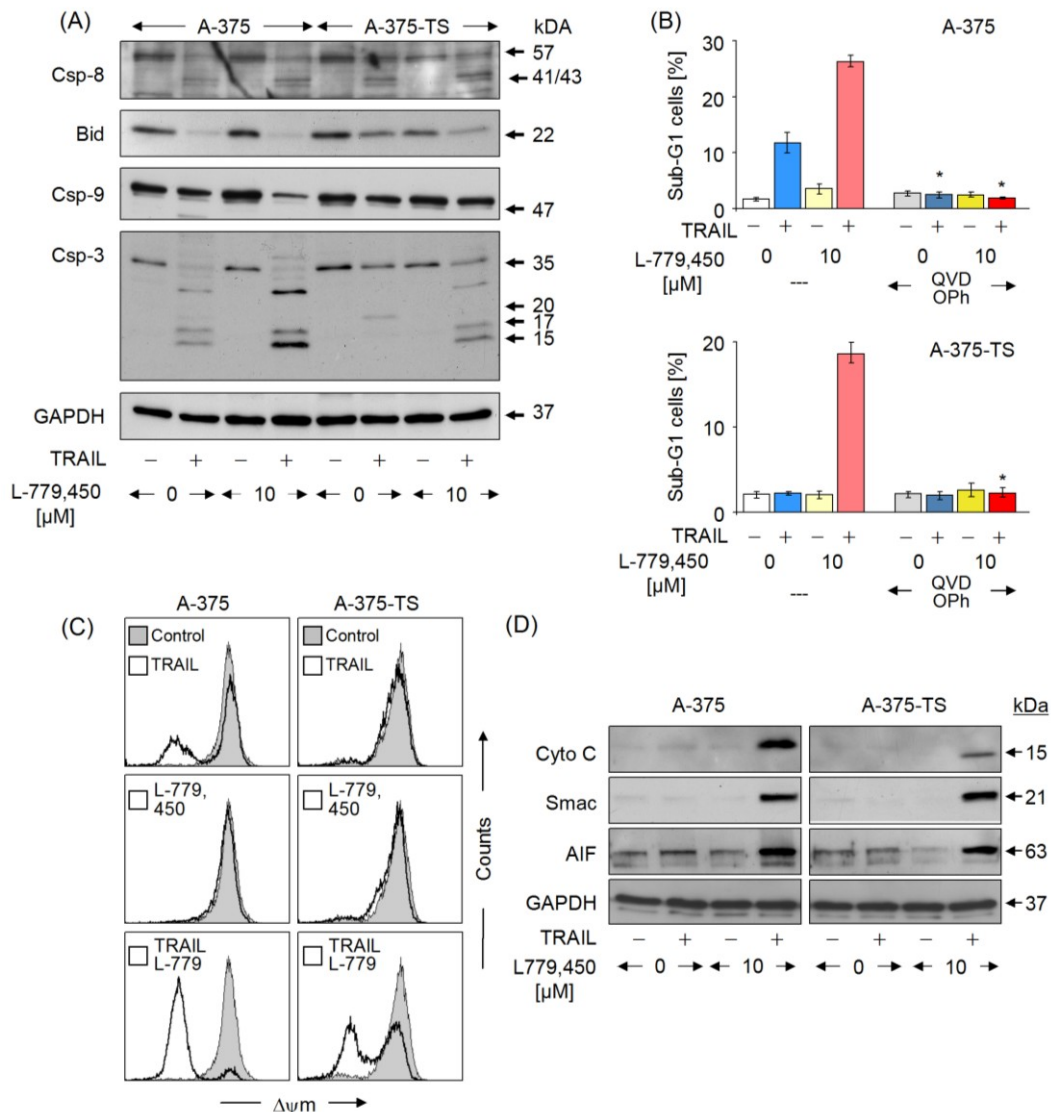


Abb. 34 Caspasen-Aktivierung durch L-779,450/TRAIL und Reaktion der Mitochondrien auf L-779,450

(A) Die Prozessierung von Caspase-8, 9 und 3 und von Bid wurde mittels Westernblot in A-375 und A-375-TS nach der Behandlung mit TRAIL +/- L-779,450 (10 μ M; 16 h) untersucht.

(B) A-375 und A-375-TS wurden zusätzlich zu TRAIL +/- BMS-345541 mit Q-VD-OPh (10 μ M, 1 h Vorbehandlung) behandelt. Die Apoptose (Sub-G1-Zellpopulationen in %) wurde nach 24 h ermittelt. Mittelwerte +/- SD von einem von zwei unabhängigen Experimenten sind dargestellt, von denen jedes Experiment aus Dreifachwerten bestand. Die signifikante Inhibierung der Apoptose durch Q-VD--OPh wurde bei einem p-Wert von < 0,05 mit [*] gekennzeichnet.

(C) Der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\psi_m$) ist nach Behandlung von A-375 und A-375-TS mit TRAIL und/oder L-779,450 (10 μ M; 24 h) dargestellt. Die behandelten Zellen (offene Graphen) wurden mit den DMSO-behandelten Kontrollen (graue Graphen) verglichen. Zwei unabhängige Experimente mit jeweils Dreifachwerten zeigten vergleichbare Ergebnisse.

(D) Zytosolische Extrakte von A-375 und A-375-TS wurden nach der Behandlung für 3 h mit TRAIL +/- L-779,450- (10 μ M) isoliert, bevor diese mittels Westernblot analysiert wurden. Eine gleiche Proteinladung wurde mittels Ponceau-Färbung und dem zytosolischen Protein GAPDH bestätigt. Zwei unabhängige Experimente zeigten vergleichbare Ergebnisse.

2.4.4 Die entscheidende Rolle von Bcl-2 und Bax in der L-779,450/TRAIL-vermittelten Apoptose

Die entscheidende Rolle des mitochondrialen Signalweges wurde ebenfalls durch die kritische Rolle, die für Bcl-2 und Bax gefunden wurde, untermauert. So konnte die Überexpression von Bcl-2 in A-375 (A375-Bcl-2) vollständig vor der Apoptoseinduktion (Abb. 35A) und dem Verlust von $\Delta\psi_m$ durch L-779,450/TRAIL (Abb. 35B) schützen. Die Rolle von Bax und Bak wurde im HCT-116-Zellmodell untersucht. Dieses Modell beinhaltet parentale HCT-116 Kolonkarzinomzellen (Bax^+/Bak^+) und Subzelllinien mit einem Bax-Knockout oder Bak-Knockdown und Doppelknockdown von Bax und Bak. Während eine effiziente Apoptoseinduktion 24 h nach Behandlung von TRAIL/L-779,450 in parentalen und Bak-Knockdown-Zellen nachgewiesen werden konnte, war die Apoptose vollständig in den Bax-Knockout- und Doppelknockdown-Zellen blockiert, was auf eine deutliche Abhängigkeit von Bax hinweist (Abb. 35C).

Die kritische Rolle von Bax unter dem Einfluss von L-779,450 wurde durch den Bax N-Terminus-spezifischen Antikörper untersucht, mit dem die Aktivierung von Bax nachgewiesen werden kann. In A-375 und A-375-TS war Bax in der gesamten Zellpopulation aktiviert (Abb. 35D). Kennzeichnend für die Aktivierung von Bax in dieser Studie war, dass die Zellen bereits auf die Behandlung von L-779,450 allein reagierten, obwohl L-779,450 keine Apoptose induziert. Die Aktivierung von Bax trat bereits 2 h nach Behandlung mit L-779,450 auf. Folglich initiiert die Aktivierung von Bax selber keine Apoptose, jedoch bewirkte sie eine Sensitivierung von Melanomzellen für TRAIL.

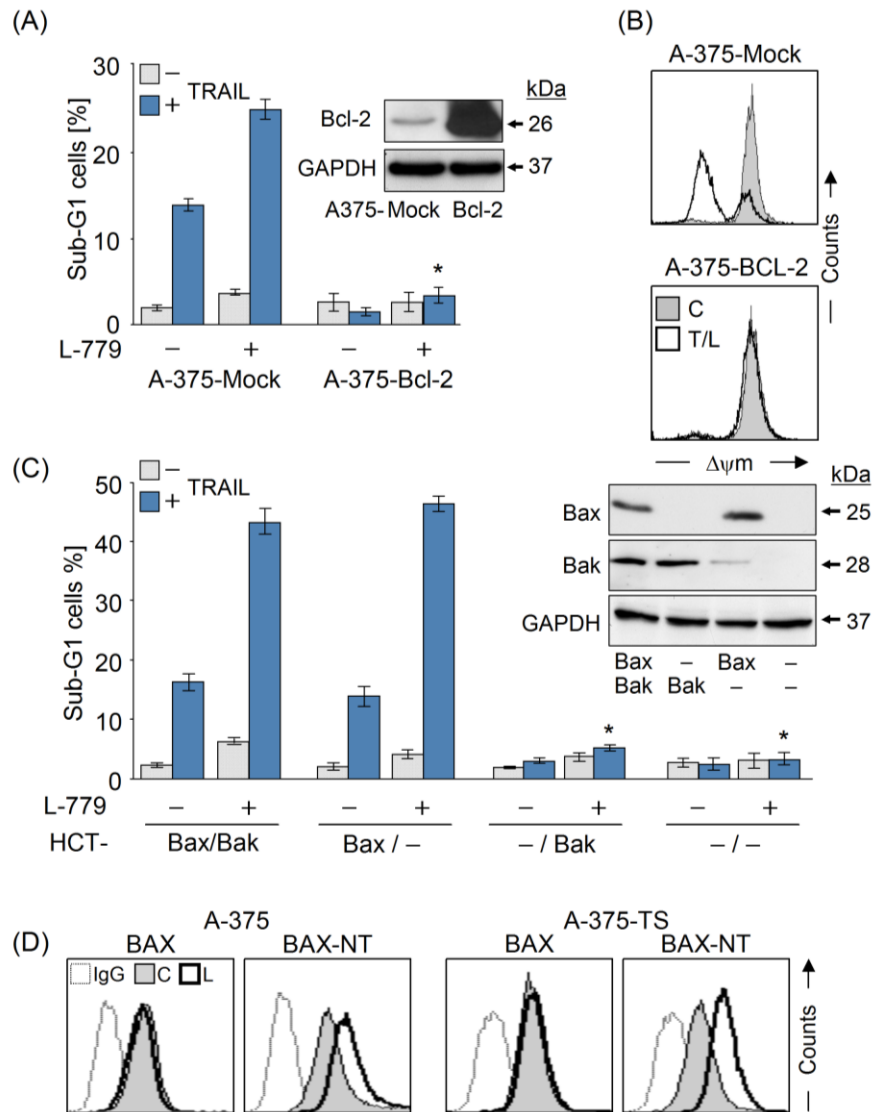


Abb. 35 Abhängigkeit von Bax und Bcl-2

(A, C) Die Apoptose, mittels L779450/TRAIL induziert, wurde in A-375, stabil transfiziert mit einem Bcl-2-Überexpressions-Konstrukt (A-375-Bcl-2) und als Kontrolle, stabil transfiziert mit einem Mock- Konstrukt in (A) untersucht. Zusätzlich wurde die Apoptoserate in Subklonen von HCT-116 (Bax^+/Bak^+) mit einem Knockdown für Bax und/oder Bak ermittelt (C). Die Expression von Bcl-2, Bax und Bak wurde mittels Westernblot-Analyse (Einschübe, GAPDH als Ladekontrolle) ermittelt. Die statistisch signifikanten Unterschiede der parentalen Zellen und Mock-Kontrollen sind dargestellt (*; $p < 0,05$).

(B) Der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\psi_m$) ist in einer Analyse von A-375-Mock und A-375-Bcl-2 mit TRAIL und L-779,450 (T/L; 10 μ M; 24 h) behandelt, dargestellt. Die behandelten Zellen (offene Graphen) wurden mit den DMSO-behandelten Kontrollen (graue Graphen) verglichen. Zwei unabhängige Experimente mit jeweils Dreifachwerten zeigten vergleichbare Ergebnisse.

(D) A-375 und A-375-TS wurden für 2 h mit TRAIL +/- L779450 (10 μ M) behandelt und anschließend für die Konformationsänderungen von Bax mittels Durchflusszytometrie analysiert (Bax-NT Antikörper). Die behandelten Zellen (offene Graphen) sind im Vergleich zu den DMSO-behandelten Kontrollen (graue Graphen) dargestellt. (A-D) Die Experimente wurden mindestens zweimal durchgeführt und zeigten vergleichbare Ergebnisse.

2.4.5 Induktion der Bim-Expression durch L-779,450

Um die Regulation der TRAIL-Sensitivierung von L-779,450 aufzuklären, wurde die Expression von multiplen Apoptoseregulatoren mittels Westernblot in Mel-HO (nur für Bim-Expression untersucht), A-375 und A-375-TS 16 h nach Behandlung mit L-779-450 analysiert. Keine signifikanten oder reproduzierbaren Veränderungen konnten für die Expression der Bcl-2-Proteine Bcl-2, Mcl-1, Bax und Bak und für die cIAPs Survivin und XIAP nachgewiesen werden (Abb. 36A). Jedoch wurde eine signifikante Hochregulation von dem BH3-only Bcl-2-Protein Bim_{EL} 16 h nach Behandlung mit L-779,450 gefunden (Abb. 36B), das als starke Induktion des mitochondrialen proapoptotischen Signalweges gilt.

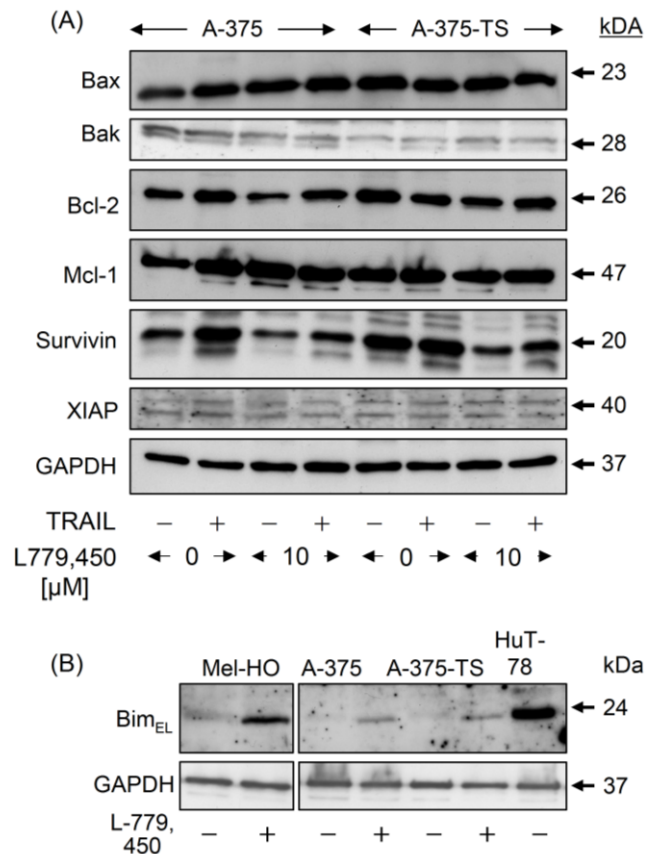


Abb. 36 Abhängigkeit von Bim

(A) Die Expression der Apoptoseregulatoren wurde in A-375-TS- und A-375-Zellen mittels Westernblot analysiert. Hierfür wurden die Zellen mit L-779,450 (10 μM) und/oder TRAIL (20 ng/ml) für 16 h behandelt. (B) Die Expression von Bim wurde mittels Westernblot in Mel-HO, A-375-TS und A-375 nach Behandlung für 16 h mit TRAIL +/- L-779,450- (10 μM) ermittelt. (A und B) Gleiche Proteinladung (30 μg/Bahn) sowie ein gleichmäßiger Proteintransfer wurden mittels Ponceau-Färbung und GAPDH-Expression bestätigt. Das Molekulargewicht ist in kDa angegeben. Die Experimente wurden mindestens zweimal durchgeführt und zeigten vergleichbare Ergebnisse.

3 Diskussion

3.1 Bedeutung von TRAIL für das Melanom

Der Todesligand TRAIL stellt eine vielversprechende Substanz für die Anti-Tumorthherapie dar. Dies ist darauf zurückzuführen, dass TRAIL in zahlreichen Krebsarten Apoptose induziert, während normale Zellen nicht beeinflusst werden (Falschlehner et al. 2009; Walczak et al. 1999). Sowohl im Maus- als auch im Primatenmodell wurde von einer Suppression des Tumorwachstums durch den Einsatz von TRAIL als Monotherapie oder in Kombination mit Chemotherapeutika berichtet (Labrinidis et al. 2009; Wang et al. 2010b). Trotz dessen weisen TRAIL und seine agonistischen TRAIL-Rezeptoren in klinischen Studien nur eine beschränkte Effizienz auf. Dies konnte u.a. in klinischen Studien von soliden Tumoren sowie Lymphomen gezeigt werden (Herbst et al. 2010; Soria et al. 2011; Younes et al. 2010). Eine nicht ausreichende Wirksamkeit kann u.a. auf eine induzierbare Resistenz zurückzuführen sein. Dies konnte beispielsweise im Tumormodell von Brustkrebszellen gezeigt werden (Zhang und Zhang 2008). In Melanomzellen wurde bereits früher von einer bestehenden TRAIL-Resistenz und einer induzierbaren Resistenz in Folge einer kontinuierlichen Behandlung mit TRAIL berichtet werden. Diese Resistenz war mit der Herunterregulation der agonistischen TRAIL-Rezeptoren, des proapoptotischen Bcl-2-Proteins Bid und der Initiatorcaspasen-8 und -10 assoziiert (Kurbanov et al. 2005; Kurbanov et al. 2007). Auch hier konnte eine Herunterregulation der TRAIL-Rezeptoren sowohl in der Proteinexpression als auch in der Oberflächenexpression gesehen werden. Diese Effekte erschienen als ein direkter und sehr früher Effekt, der schon 8 h nach TRAIL-Behandlung in A-375 auftrat. Dieses Resultat wirft ein neues Licht auf die TRAIL-Resistenz in Melanomzelllinien. Hierbei scheint eine durch TRAIL selbst induzierte schnelle programmierte TRAIL-Resistenz in benannten Zelllinien einzusetzen. Als ein zweites Anzeichen der TRAIL-Resistenz im Melanom konnte die Inhibierung der kompletten Prozessierung von Caspase-3 gezeigt werden. Diese Effektorcaspase ist als ein 35 kDa Proenzym exprimiert, welches im ersten Schritt zu einer 20 kDa intermediären Form prozessiert wird. Es wird vermutet, dass die finale Prozessierung auf eine Autokatalyse zurückzuführen ist, welche in der 17 kDa und letztendlich 15 kDa Form resultiert (Roy et al. 2001). Diese Kaskade war deutlich in den parentalen A-375 Melanomzellen nach TRAIL-Behandlung sichtbar. Im Gegensatz dazu zeigten die TRAIL-selektierten A-375 nach TRAIL-Behandlung keine 17 kDa und 15 kDa Spaltprodukte, jedoch hohe Level an dem 20 kDa intermediären Spaltprodukt und eine effiziente

Prozessierung der Caspase-8. Folglich sind die resistenten Zellen durch eine Blockade der autokatalytischen Aktivität der Caspase-3 charakterisiert, was eventuell auf eine ungenügende Aktivierung der Caspasenkaskade zurückzuführen ist.

Die Überwindung der Resistenz repräsentiert somit einen kritischen Schritt durch Initiatorcaspasen zur Etablierung TRAIL-basierter Therapie. Viele Möglichkeiten, um dieses Ziel zu erreichen, wurden bereits getestet (Hornle et al. 2011; Ivanov et al. 2008; Jiang et al. 2007). Im Folgenden werden verschiedene Strategien zur Überwindung der TRAIL-Resistenz näher diskutiert.

3.2 Sensitivierung für die TRAIL-induzierte Apoptose durch 8-Rha- β

3.2.1 Überwindung der Todesliganden-Resistenz durch das Indirubin 8-Rha- β

Eine Möglichkeit für TRAIL zu sensitivieren, stellen Komponenten, welche aus Kräuterextrakten isoliert wurden, dar. So wurde von zahlreichen Bestandteilen aus der chinesischen Medizin berichtet, die für TRAIL sensitivieren können. Dazu gehören u.a. das Triptolid und das Flavonoid Wogonin, welche u.a. in Leukämiezellen getestet wurden (Carter et al. 2008; Fas et al. 2006). Ein weiterer aktiver Bestandteil der chinesischen Medizin stellt Indirubin, ein rotes Isomer des Indigos dar. Indirubin und seine entsprechenden Derivate sind potente Kinaseinhibitoren. Diesbezüglich wurde von der Inhibierung von GSK-3 β , CDKs, c-Src und FGF-R1 berichtet (Meijer et al. 2003; Perabo et al. 2006; Zhen et al. 2007). Zusätzlich können andere Kinasen aktiviert werden (insbesondere ist hierbei die Aktivierung der p38 MAP-Kinase zu erwähnen) (Zhen et al. 2007). Als ein Hauptmerkmal zeigt sich der Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase, von dem bereits bei Indirubin-Derivaten berichtet wurde (Hoessel et al. 1999). Dies konnte auch hier in drei der sechs untersuchten Melanomzelllinien beobachtet werden. Ein anderer Effekt ist die Induktion der Apoptose, welche auf das Indirubin zurückzuführen ist (Perabo et al. 2009; Ribas et al. 2006). Ebenfalls konnte von dem proapoptotischen Effekt in humanen Melanomzelllinien durch das Indirubin-Derivat 8-Rha- β berichtet werden (Kunz et al. 2010). Hier präsentieren wir einen deutlichen Beweis dafür, dass diese Substanz in der Lage ist, effizient die Sensitivität für Todesliganden bei Melanomzellen zu erhöhen und sowohl die bestehende als auch induzierbare Resistenz zu überwinden. Von Kombinationen von TRAIL und anti-CD95-Antikörpern, wie sie hier verwendet wurden, wurde bisher nicht berichtet. Jedoch konnte gezeigt werden, dass das Derivat Indirubin-3'-monoxime I3M in Lungenkarzinomzellen für die TNF- α -induzierte Apoptose sensitivieren

kann. In diesen Zellen war der Effekt der Sensitivierung mit einer Verminderung der NF- κ B-Aktivität verbunden (Sethi et al. 2006).

3.2.2 Mechanismen in der Indirubin-vermittelten TRAIL-Sensitivierung

Es konnte hier einen klarer Beweis präsentiert werden, dass in Melanomzellen der Tumorsuppressor p53 durch Indirubin 8-Rha- β aktiviert wird. Dies wurde durch erhöhte Proteinlevel an p53 gesehen, welche normalerweise durch seine Stabilität geregelt werden (Lu und El Deiry 2009). Ferner waren Bax, Bad und beide agonistischen TRAIL-Rezeptoren durch Behandlung mit 8-Rha- β hochreguliert, welche charakteristische Ziele von p53 darstellen (Bossi und Sacchi 2007; Jiang et al. 2006). Eine verstärkte Aktivität von p38 könnte die Aktivierung des p53-Signalweges im Melanom erklären. Die Aktivierung von p38 konnte bereits als ein Haupteffekt von Indirubin beschrieben werden (Zhen et al. 2007). Des Weiteren kann p53 durch p38 aktiviert werden (Bulavin und Fornace, Jr. 2004; Cuadrado und Nebreda 2010). Effekte auf p53 wurden bereits im Cervixkarzinom- und Lungenkrebszellen für andere Indirubin-Derivate benannt, welche zusätzlich mit der Hochregulation des Zellzyklus-Inhibitors p21 verbunden sind (Lee et al. 2005; Shi und Shen 2008). Folglich könnte die Aktivierung von p53 einen kritischen Punkt in der Indirubin-vermittelten Zellzyklus-Inhibierung und der Induktion der Apoptose darstellen, was auch durch die Inhibierung der Apoptose in p53-defizienten Zellen bestätigt wird.

Die Aktivierung des p53-Signalweges kann auch aus der Behandlung mit Chemotherapeutika resultieren (Lu und El Deiry 2009). Die Kombination von chemotherapeutischen Wirkstoffen mit Indirubin resultierte in unbeständigen Ergebnissen. Während Indirubin 8-Rha- β die Apoptose mit hohen Dosen an Doxorubicin verstärkte, zeigte sich eine Inhibierung der Apoptose in der Kombination mit Paclitaxel. Diese Resultate deuten auf die Selektivität des Wirkstoffs Indirubin 8-Rha- β hin, welcher besonders die Sensitivität der Todesliganden beeinflusst und somit den extrinsischen Signalweg unterstützt.

Die Rolle von p53 in Melanomzellen ist nicht vollständig geklärt. Trotz des Fehlens inaktivierender Mutationen scheint der p53-Signalweg in Melanomzellen blockiert zu sein, was auch durch die deutliche Resistenz gegenüber Chemotherapeutika unterstrichen wird (Eberle et al. 2007b; Satyamoorthy und Herlyn 2002). Folglich scheint Indirubin die Blockierung der p53-Aktivierung in Melanomzellen, soweit es die Todesliganden-Sensitivität betrifft, zu überwinden.

Die Hochregulation von Bax und Bad durch Indirubin 8-Rha- β ist mit einer parallelen Aktivierung des intrinsischen mitochondrialen Signalweges in A-375-TS verbunden. Dies konnte mit dem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials, der Freisetzung von Cytochrom C und AIF sowie der Prozessierung von Caspase-9 demonstriert werden. Die Expression von Bcl-2 ist von hoher Bedeutung für die Apoptosedefizienz von Melanomzellen (Wacheck et al. 2002). Somit wurden A-375-Zellen mit Bcl-2 stabil transfiziert (Raisova et al. 2001), welche komplett sowohl die Apoptose durch TRAIL als auch CH-11, den agonistischen CD-95 Antikörper blockieren. Der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials war ebenfalls nach Behandlung mit Indirubin in diesen Zellen vollständig blockiert. Dessen ungeachtet schien die Apoptoseinduktion in der Kombination von Indirubin mit TRAIL nur partiell blockiert zu sein. Dies zeigt, dass Indirubin sowohl den intrinsischen als auch extrinsischen Signalweg, von dem nur der intrinsische Teil durch Bcl-2 blockiert werden konnte, beeinflusst. Schon in früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die Verstärkung des mitochondrialen Signalweges essentiell für die Todesliganden-induzierte Apoptose in Melanomzellen ist (Raisova et al. 2000). Letztendlich ist Indirubin in der Lage, die Bcl-2-vermittelte Blockierung der Apoptose zu überwinden.

Zusätzlich resultiert die Kombination mit TRAIL in einer Herunterregulation von Mcl-1 und XIAP. Die gleichzeitige Abnahme dieser zwei Proteine wurde auch für Leukämiezellen nach Induktion der Apoptose beobachtet (Song et al. 2010), was eine parallele Regulation vermuten lässt. Da XIAP ein starker Inhibitor von Caspase-3 ist (Bratton et al. 2002), könnte dies teilweise die Herunterregulation der vollen Prozessierung von Caspase-3 in A-375-TS nach Kombinationsbehandlung erklären.

Die vorliegende Studie präsentiert deutlich eine klare Heraufregulation von sowohl DR4 als auch DR5 durch Indirubin in Melanomzellen. Die darauffolgende Verstärkung des extrinsischen Apoptosesignalwege wurde durch die Prozessierung der Caspase-8 offensichtlich. Von der Hochregulation der Todesrezeptoren durch das Indirubin-Derivat I3M wurde im Cervixkarzinom berichtet (Shi und Shen 2008). Des Weiteren konnten beide Todesrezeptoren in Krebszelllinien u.a. durch Celastrol, ebenfalls einem Bestandteil der traditionellen chinesischen Medizin, hochreguliert werden (Sung et al. 2010). Obgleich die TRAIL-Resistenz in Melanomzellen mit einer schnellen Herunterregulation der Todesrezeptoren verbunden war, erscheint die Hochregulation durch das Indirubin ein geeigneter ausgleichender Effekt, der vor der induzierbaren Resistenz schützen kann.

3.3 Sensitivierung für die TRAIL-induzierte Apoptose mittels BMS-345541

3.3.1 Die Wirkung von BMS-345541 auf Melanomzellen

Die Apoptoseresistenz von Krebszellen wurde mit einer hohen Aktivität von NF- κ B in Verbindung gebracht, die in einer Dysregulation von IKK resultiert (Ben Neriah und Karin 2011). BMS-345541 wurde als ein IKK-Inhibitor beschrieben (Burke et al. 2003). Seine NF- κ B-inhibierende Aktivität konnte hier in Kombinationen mit TNF- α nachgewiesen werden. Folglich sind die Effekte von TNF- α , wie die Degradation von I- κ B α und die nukleäre Translokation von NF- κ B p65, durch geringe Dosen an BMS-345541 reduziert. Diese inhibierende Aktivität könnte einige proapoptotische und antiproliferative Effekte von BMS-345541 zu späten Zeitpunkten nach der Behandlung erklären. Von diesen Effekten wurde bereits in Leukämiezellen berichtet, in denen BMS-345541 ebenfalls Apoptose induzieren kann (Lopez-Guerra et al. 2009). Von höheren Konzentrationen an BMS-345541 (10 μ M) konnte auch gezeigt werden, dass sie in Melanomzellen Apoptose induzieren können, welche Caspase-unabhängig ist und mit der Freisetzung von AIF in Verbindung gebracht werden konnte (Yang et al. 2006). Die Unabhängigkeit von Caspasen von dem direkten proapoptotischen Effekt durch BMS-345541 konnte auch in der hier dargestellten Studie durch die Verwendung des Caspaseinhibitors zVAD-fmk gezeigt werden.

3.3.2 TRAIL-Sensitivierung von Melanomzellen durch BMS-345541

Eines der wichtigsten Resultate der vorliegenden Studie ist das Ergebnis, dass geringe Dosen an BMS-345541 (2-5 μ M), welche selbst keine signifikante Apoptose in Melanomzellen induzieren, effizient die TRAIL-induzierte Apoptose verstärken und die permanente und induzierbare TRAIL-Resistenz überwinden konnte. Die Sensitivierung für TRAIL durch BMS-345541 konnte sowohl in Kolonkarzinom-, als auch Neuroblastomzellen beobachtet werden, was in diesen Zellen mit der Inhibierung von NF- κ B im Zusammenhang stand (Ammann et al. 2009; Jani et al. 2010).

Der NF- κ B-Signalweg kann auch durch das Signal von Todesrezeptoren aktiviert werden, und die TRAIL-vermittelte NF- κ B-Aktivierung wurde mit der TRAIL-Resistenz in Leukämien, im Gallengangskarzinom (Ehrhardt et al. 2003; Falschlehner et al. 2007) und in Melanomzellen diskutiert (Franco et al. 2001). Jedoch konnte keine Korrelation zwischen der TRAIL-Resistenz und der NF- κ B-Aktivierung in Melanomzellen gefunden

werden. Vielmehr waren TRAIL-sensitive Melanomzelllinien durch ihre besonders hohe NF- κ B-Aktivierung charakterisiert (Kurbanov et al. 2007). In der hier dargestellten Studie konnte keine frühe Degradation von I- κ B α oder eine frühe nukleäre Translokation von p65 in Antwort auf die TRAIL-Behandlung beobachtet werden. Folglich kann der frühe Effekt von BMS-345541 in Melanomzellen nicht nur durch die Inhibierung der NF- κ B-Induktion erklärt werden.

Bezugnehmend auf die Aktivierung der Caspasen war die Prozessierung der Initiatorcaspase-8 in A-375 und A-375-TS bereits nach TRAIL-Behandlung zu beobachten, obwohl die Prozessierung von Caspase-8 nicht weiter durch die Kombination verstärkt werden konnte. Dies lässt vermuten, dass die Verantwortung der Apoptoseinduktion weiter unterhalb der Signalkaskade liegt. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen zeigten andere Strategien wie die Kombination mit Resveratrol die Verstärkung der Caspase-8-Prozessierung (Ivanov et al. 2008).

3.3.3 Mitochondrial-abhängige TRAIL-Sensitivierung durch BMS-345541

Sehr charakteristisch für die Kombination von BMS-345541/TRAIL scheint die Verstärkung des mitochondrialen Signalweges zu sein, welcher durch den frühen Verlust des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\psi_m$ und der Freisetzung von proapoptotischen mitochondrialen Faktoren gekennzeichnet war. Die Initiationsphase war insbesondere durch den Verlust von $\Delta\psi_m$, bevor Apoptose induziert war, charakterisiert. Diese unterschied sich von der Amplifikationsphase, bei der die verstärkte Apoptose mit einem weiteren Verlust an $\Delta\psi_m$ einherging. Die Rolle des mitochondrialen Signalweges konnte gezeigt werden, indem die Apoptose vollständig durch die Überexpression von Bcl-2 oder eines Knockdowns von Bax gehemmt werden konnte. Die Aktivierung des mitochondrialen Signalweges in Melanomzellen im Zuge der TRAIL-Sensitivierung konnte sowohl mittels eines Kaliumkanalinhibitors, als auch mittels UVB gezeigt werden (Hornle et al. 2011; Quast et al. 2012).

Die Hoch- oder Herunterregulation von Apoptoseregulatoren kann ausschlaggebend für die verstärkte Apoptose sein, aber der Zeitablauf muss weiter untersucht werden. Im Zuge der BMS-345541/TRAIL-induzierten Apoptose waren Mcl-1 und XIAP herunterreguliert, was aber als sekundärer Effekt wahrscheinlich zur Amplifikationsphase beiträgt. Folglich waren Mcl-1 und XIAP im Zuge der Apoptoseinduktion herunterreguliert. Beide wurden als Zielstrukturen von Caspase-3 beschrieben (Hornle et al. 2011; Weng et al. 2005).

Die cIAPs können durch die direkte Bindung an Caspase-9 und Caspase-3 vor Caspase-vermittelter Apoptose schützen (Mannhold et al. 2010). Insbesondere wird XIAP als ein wichtiger antiapoptotischer Faktor in Krebszellen angesehen (Fulda und Vucic 2012), und seine vorherrschende Rolle konnte in Melanomzellen demonstriert werden (Hornle et al. 2011; Quast et al. 2012). Folglich kann auch eine hohe Aktivität der cIAP für die unterdrückte Funktion der Caspase-3, welche in Reaktion auf TRAIL beobachtet werden konnte, verantwortlich sein.

Da Smac in der Lage ist, die Aktivität der cIAPs zu blockieren (Fulda und Vucic 2012), stellt dieses Protein einen möglichen Kandidaten dar, um die effiziente Apoptoseinduktion durch BMS-345541/TRAIL zu erklären. Die genaue Funktion von Smac wurde mittels eines siRNA-vermittelten Knockdown überprüft, welcher stark die BMS-345541/TRAIL-induzierte Apoptose reduzieren konnte, wohingegen die verbleibende Apoptose auf die Effekte von BMS-345541 allein zurückzuführen sein könnte. Hinsichtlich des mitochondrialen Membranpotentials schützte der Knockdown von Smac vor der Amplifikationsphase, wohingegen der initiale Verlust von $\Delta\psi_m$ weiterhin beobachtet werden konnte. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass Smac weiter unterhalb in der Signalkaskade der BMS-345541/TRAIL-induzierten Apoptose liegt. Der Knockdown von Smac konnte ebenfalls die Apoptose in Melanomzellen unterdrücken, wenn diese durch die Kombination von TRAIL mit UVB oder einem Inhibitor des Kaliumkanals induziert wurde (Hornle et al. 2011; Quast et al. 2012).

3.3.4 Der Einfluss von Bid und Bax auf die BMS-345541-vermittelte TRAIL-Sensitivierung

Das proapoptotische Bcl-2-Protein Bid stellte einen denkbaren Regulator dar, der den Beitrag von TRAIL in der Kombination mit BMS-345541 durch die mögliche Aktivierung von Caspase-8 durch Bid erklären könnte (Li et al. 1998). In der Tat konnte der siRNA-vermittelte Bid Knockdown die BMS-345541/TRAIL-induzierte Apoptose fast vollständig aufheben. Die noch verbleibende Apoptose konnte auch hier auf den Effekt von BMS-345541 allein zurückgeführt werden. Der Knockdown von Bid schützte vor dem Verlust an $\Delta\psi_m$ sowohl in der Amplifikationsphase, als auch der Initiationsphase. Folglich scheint Bid eine Funktion oberhalb der Regulationskaskade in der BMS-345541/TRAIL-vermittelten Apoptose einzunehmen. Es konnte ebenfalls in anderen Studien gezeigt werden, dass ein Knockdown von Bid die Apoptose durch TRAIL in Kolonkarzinomzellen

und durch die Kombinationsbehandlung von TRAIL und Etoposid in Zellen von Mesotheliomen unterdrücken konnte (Broaddus et al. 2005; Gillissen et al. 2010). Bcl-2 wird in Betracht gezogen, dass es ein dominanter antiapoptotischer Faktor in Melanomzellen ist (Eberle et al. 2007b; Jansen et al. 2000). Zusätzlich soll die Hauptfunktion von aktivierten Bid, tBid, darin liegen, Bcl-2 zu inhibieren (Chipuk et al. 2010).

Die Experimente zeigten eindeutig eine wichtige Rolle von Bax, was durch dessen mitochondriale Translokation und dessen Konformationsänderung unterstützt wurde. Auch geringe Dosen an BMS-345541, die hier angewendet wurden, resultierten in einer starken Aktivierung von Bax, welche bemerkenswerter Weise als früher Effekt auftrat (1-2 h), bevor Apoptose induziert wurde. Andere Studien konnten eine Bax-Aktivierung in Reaktion auf eine Behandlung mit BMS-345541 allein zeigen. Diese unterschieden aber nicht deutlich zwischen frühen und verzögerten Effekten (Lopez-Guerra et al. 2009; Yang et al. 2006). Von einer Freisetzung von AIF 4 h nach Behandlung mit hohen Dosen an BMS-345541 in Melanomzellen wurde berichtet, welche auf die Caspase-unabhängigen und direkten Effekte von BMS-345541 zurückzuführen sein könnte (Yang et al. 2006). Die frühe Bax-Aktivierung, die in unserer Studie gezeigt werden konnte, könnte hier die Sensitivierung für TRAIL erklären.

Die Frage nach der Aktivierungsart von Bax ist größtenteils noch ungelöst, bedarf jedoch aufgrund ihrer Relevanz in der Apoptoseforschung zügige Klärung. Die Bax-inaktivierende Phosphorylierung an Serin-184 und die aktivierende Phosphorylierung an Threonin-167 wurden bereits diskutiert (Kim et al. 2006a; Renault und Manon 2011). Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden nur vereinzelte Nachweismethoden angewendet, um diese Frage zu beantworten. Diese Methoden basierten auf Bax-Immunopräzipitation und anschließendem Immunnachweis mittels Antikörpern gegen Phosphoserin bzw. Phosphothreonin oder radioaktiver Markierung (Gardai et al. 2004; Kim et al. 2006a; Renault und Manon 2011; Shen et al. 2009; Xin und Deng 2005). Hier wird eine direkte Nachweismethode vorgestellt, welche auf der Zellpermeabilisierung, Phosphorylierungsspezifischen Antikörpern gegen Bax und Durchflusszytometrie basiert. Diese Nachweismethode gibt einen umfassenden Überblick über den Phosphorylierungsstatus von Bax vor und nach der Behandlung mit BMS-345541.

Folglich korreliert die Aktivierung von BMS-345541 eng mit der verminderten Phosphorylierung von Bax an Serin-184 und der verstärkten Phosphorylierung an Threonin-167. Diese Effekte traten unmittelbar (1 h) nach der Behandlung mit BMS-

345541 auf. Unterschiedliche Kinasen könnten für diese spezifischen Umstände verantwortlich sein. IKK- β kann Bcl-2-Proteine phosphorylieren, wie für antiapoptotische Familienmitglieder (Bcl-2 and Bcl-x_L) gezeigt werden konnte. In diesem Fall führt es zu deren Inaktivierung (Bodur et al. 2012; Khoshnan et al. 2009). Auch Akt kann Bax phosphorylieren (Serin-184; (Gardai et al. 2004; Xin und Deng 2005), wohingegen diese Stelle von der Proteinphosphatase PP2A dephosphoryliert werden kann (Xin und Deng 2005). Die Phosphorylierung von Threonin-167 wurde mit den JNK-und p38-Signalwegen in Verbindung gebracht, wie es in Staurosporin-behandelten Hepatom oder Chemotherapeutika-behandelten Retinoblastomzellen beobachtet werden konnte (Kim et al. 2006a; Min et al. 2011). IKK β soll JNK inaktivieren (Deng et al. 2010), und die Phosphorylierung von Bax an Threonin-167 wurde in Eosinophilen unterhalb des ERK-Signalweges beobachtet (Shen et al. 2009). Die Aktivierung von ERK im Zuge der Behandlung mit BMS-345541 wurde auch bei Melanomzellen berichtet (Yang et al. 2009). Die effiziente Induktion der Apoptose von TRAIL/BMS-345541 wurde wahrscheinlich durch die Inhibierung von Bcl-2 durch tBid und der direkten Aktivierung von Bax durch veränderte Phosphorylierung ermöglicht. Beide Schritte zusammen resultieren in der Freisetzung von Smac, welche cIAPs inhibieren, was wiederum die Caspasenkaskade öffnet.

Für den Kinaseinhibitor BMS-345541 konnte deren Effizienz im Mausmodell (Yang et al. 2009) als auch ex-vivo in Leukämiezellen (Lopez-Guerra et al. 2009) nachgewiesen werden. Auch in Kombinationen konnte BMS-345541 oder andere IKK-Inhibitoren die Antitumoraktivität von Zytostatika und Todesliganden verstärken (Ammann et al. 2009; Jani et al. 2010; Lopez-Guerra et al. 2009; Schön et al. 2008; Yang et al. 2009). Diese Effekte wurden in diesen Fällen auf die Inhibierung der antiapoptotischen Funktion von NF- κ B zurückgeführt. In unserer Studie konnte eine zusätzliche Funktion von BMS-345541, seine Aktivierung von Bax, identifiziert werden, welche von besonderer Wichtigkeit für die Apoptoseregulation sein könnte. Dieser Effekt von BMS-345541 kann deutlich von der Funktion von NF- κ B abgrenzt werden, da die Aktivierung von Bax bereits 1 h nach Behandlung nachweisbar war, was nicht durch die NF- κ B-vermittelte Transkriptionskontrolle zu erklären ist.

3.4 Sensitivierung für die TRAIL-induzierte Apoptose durch den pan-RAF-Inhibitor L-779,450

3.4.1 TRAIL-Sensitivierung von Melanomzellen durch L-779,450

MAP-Kinase-Signalweg, aktiviert durch Ras/RAF, spielt eine entscheidende Rolle im Melanom (Davies et al. 2002). So werden derzeit selektive Inhibitoren für das mutierte BRAF wie Vemurafenib und Dabrafenib in klinischen Studien bewertet (Davar et al. 2012; Hauschild et al. 2012). L-779,450 wurde als pan-RAF-Inhibitor beschrieben, der in der Lage ist A-, B- und CRAF zu blockieren (Shelton et al. 2003). Eine CRAF-Aktivierung in Folge einer BRAF-Inhibierung wird im Zusammenhang mit Resistenzentwicklung und Rezidiven beim Melanom diskutiert (Heidorn et al. 2010; Maurer et al. 2011). Die gleichzeitige Inhibierung von beiden RAF-Isoformen könnte als eine unterstützende Therapie in Betracht gezogen werden. Die effiziente Inhibierung des MAPK-Signalweges durch L-779,450 wurde hier in Melanomzellen durch eine vollständige Aufhebung der Phosphorylierung von ERK nachgewiesen.

Die Inhibierung des Zellwachstums in Ansprechen auf die BRAF-Inhibierung konnte für L-779,450 in hämatopoetischen Zellen (Shelton et al. 2003) und für PLX4720 in Kolonkarzinomzellen gezeigt werden (Oikonomou et al. 2011). Signifikante antiproliferative Effekte von L-779,450 in Melanomzellen konnten hier gezeigt werden, die deutlich mit einem G1-Arrest assoziiert waren. Diese Effekte waren aber nur auf die BRAF-mutierten Melanomzellen beschränkt, wohingegen BRAF-Wildtyp-Zellen nicht auf die Behandlung ansprachen.

Obwohl L-779,450 allein kaum Apoptose induziert, verstärkte es effizient die TRAIL-induzierte Apoptose. So konnte die permanente und induzierbare TRAIL-Resistenz in allen BRAF-mutierten Melanomzelllinien überwunden werden. Auch hier konnten die BRAF-Wildtyp-Zellen nicht sensitiviert werden, was eine Verbindung zwischen der BRAF-Aktivierung und der TRAIL-Resistenz vermuten lässt. Von der Verstärkung der TRAIL-Sensitivität wurde bereits in Kolonkarzinomzellen mittels des BRAF-Inhibitors PLX4720 berichtet (Oikonomou et al. 2011).

3.4.2 Mechanismen der L-779,450-vermittelten TRAIL-Sensitivierung

Hinsichtlich des Mechanismus kann gesagt werden, dass die Effektorcaspasen an diesem Prozess involviert waren, was durch die verstärkte Prozessierung von Caspase-3 und die

Inhibierung der Apoptose mittels Caspaseinhibitoren nachgewiesen werden konnte. Jedoch war die Aktivierung der Initiatorcaspasen (Caspase-8, Caspase-9) nicht verstärkt, was auf den mitochondrialen Apoptosesignalweg mit der Freisetzung von Smac hindeutet. Smac kann die Aktivierung von Caspase-3 vermitteln, indem es die Blockade von XIAP überwindet (Chai et al. 2000). So wurde in Melanomzelllinien Caspase-3 zu einem Spaltprodukt der Größe von 20 kDa bereits nach TRAIL-Behandlung prozessiert, obwohl nur eine geringe oder sogar komplett blockierte Apoptose vorlag. Eine vollständige Prozessierung von Caspase-3 mit den 15 und 17 kDa großen Spaltprodukten wurde mit der Kombination mit L-779,450 erreicht. Auf die Bedeutung des Gleichgewichts von Smac/XIAP für das Melanom wurde bereits in früheren Studien in Verbindung mit der Apoptoseresistenz hingewiesen (Hornle et al. 2011; Quast et al. 2012).

Die Aktivierung des mitochondrialen Apoptosesignalweges konnte bereits 3 h nach der Behandlung durch die Freisetzung proapoptotischer Faktoren (Smac, Cytochrom c und AIF) nachgewiesen werden. Die Rolle des mitochondrialen Signalweges in der Sensitivierung von Melanomzellen für TRAIL konnte bereits mittels anderer Signalweginhibitoren beobachtet werden (siehe Abschnitt 2.2; (Quast et al. 2012)). Die Bcl-2-Proteine, welche diese Signalwege kontrollieren, haben auf besondere Weise die Apoptoseinduktion von L-779,450/TRAIL bestimmt. So war die Apoptose vollständig durch die Bcl-2-Überexpression oder den Bax-Knockout blockiert.

Die entscheidende Rolle von Bax in der Apoptoseresistenz wurde durch die Anwendung eines N-terminal-spezifischen Antikörpers von Bax sichtbar, der eine Aktivierung von Bax nachweisen konnte. So resultierte die Behandlung von L-779,450 alleine in einer signifikanten Aktivierung von Bax bereits 2 h nach Behandlung, obwohl noch keine Apoptoseinduktion zu beobachten war. Folglich induziert L-779,450 keine Apoptose, aber öffnet die Pforte für die Apoptoseinduktion anderer Stimuli wie TRAIL, wobei hier der Schalter die Aktivierung von Bax darstellt.

Für unterschiedliche Apoptoseregulatoren wurden beschrieben, dass sie durch den MAPK-Signalweg kontrolliert werden, wie die Hochregulation von Mcl-1 und Survivin oder die Herunterregulation von Bad und Bim (Ai et al. 2006; Cartlidge et al. 2008; McCubrey et al. 2007). Wohingegen keine signifikanten Veränderungen in der Expression von Bcl-2, Mcl-1, Bax, Bak und Survivin beobachtet werden konnten, war Bim_{EL} signifikant in Melanomzellen durch die Behandlung von L-779,450 hochreguliert. Die Isoformen von Bim repräsentieren effiziente Induktoren der Apoptose durch die Blockierung aller antiapoptotischer Bcl-2-Proteine (Chen et al. 2005). Die Beziehung von Bim und MAPK

basiert auf der ERK-vermittelten Phosphorylierung, welche den proteasomalen Abbau vermittelt (Cartlidge et al. 2008). Folglich kann die Hochregulation von Bim in Ansprechen auf L-779,450 signifikant zu der Aktivierung von Bax und der Sensitivierung für die TRAIL-induzierte Apoptose in Melanomzellen beitragen.

3.5 Fazit

Zusammenfassend präsentieren diese Ergebnisse effiziente Strategien, um die Resistenz gegenüber Todesliganden in Melanomzellen zu überwinden und vor dieser zu schützen. Die in dieser Arbeit angeführten Untersuchungen bieten eine Grundlage für das Verständnis der Mechanismen von der Sensitivierung der TRAIL-induzierten Apoptose in Melanomzellen. Letztendlich kann gesagt werden, dass das unterdrückte Ansprechen von Melanomzellen auf TRAIL auf drei wichtige antiapoptotische Schritte zurückzuführen ist. Diese sind 1) Die hohen Levels an Bcl-2-Proteinen, 2) hohe Level an cIAPs und 3) die unterdrückte Aktivierung von Bax. So erscheint die Modulation der Bax-Phosphorylierungslevel, welche die Aktivierung von Bax beeinflussen können (Kim et al. 2006a; Renault und Manon 2011), als eine sehr geeignete Strategie, um die TRAIL-Sensitivität von Melanomzellen zu erhöhen, sodass über therapeutische Strategien diesbezüglich nachgedacht werden müsste. Aber auch über die Anwendung von Smac-Mimetika, welche in der Lage sind, XIAP zu blockieren (Fulda und Vucic 2012), müssten bei der Überwindung der TRAIL-Resistenz in der Melanomtherapie in Betracht gezogen werden.

Anlässlich der jüngsten klinischen Studien ist ein Durchbruch bei der Melanomtherapie mit der Einführung des niedermolekularen Inhibitors gegen das mutierte BRAF (Vemurafenib) zu erwarten (Sosman et al. 2012). Hierbei existiert eine gut beschriebene Verbindung zwischen der BRAF-Inhibition und der Bim-Expression. Die Bim-Phosphorylierung durch ERK fördert eine proteasomale Degradation (Pinon et al. 2008). Demzufolge repräsentiert das proapoptotische Bcl-2-Protein Bim ein hoch wirksames Zielprotein für Melanomzellen. Therapeutische Strategien zur Überwindung der TRAIL-Resistenz sollten gegebenenfalls darauf getestet werden, ob sie in der Lage sind, diesen wichtigen proapoptotischen Faktor hoch zu regulieren.

Unter Berücksichtigung, dass Todesliganden physiologische Signale von T-Lymphozyten in der anti-tumoralen Immunüberwachung darstellen (Guicciardi und Gores 2009), könnten sie die Immunantwort gegen das Melanom unterstützen. Hinsichtlich möglicher proapoptotischer Therapieansätze erscheint TRAIL als Monotherapie durch die sich

schnell entwickelnde Resistenz nicht ausreichend zu sein (Dimberg et al. 2012). Jedoch könnte die Verwendung von DR4 und DR5 spezifischen agonistischen Antikörpern, dessen Wirksamkeit bereits in klinischen Studien untersucht wird, in Kombination mit den hier verwendeten Kinaseinhibitoren, Indirubin 8-Rha- β , BMS-345541 und L-779,450, einen Durchbruch in der TRAIL-vermittelten Therapie erzielen.

4 Material und Methoden

4.1 Zelllinien und Zellkultivierung

4.1.1 Zelllinien

Folgende humane Melanom-Zelllinien wurden eingesetzt: A-375 (Giard et al. 1973) und Mel-HO (Holzmann et al. 1988) wurden aus Primärtumoren generiert. MeWo (Bean et al. 1975) und Mel-2a (Bruggen et al. 1981) wurden aus Metastasen gewonnen. Zusätzlich wurden humane Melanom-Zelllinien mit einer erworbenen TRAIL-Resistenz verwendet. Hierzu gehörten A-375-TRAIL-selektiert (A-375-TS) und Mel-HO-TRAIL-selektiert (Mel-HO-TS) (Kurbanov et al. 2007).

Sub-Klone von A-375 wurden aus einer stabilen Transfektion von einem pIRES-Bcl-2-Konstrukt (A375-Bcl-2), beziehungsweise von einem pIRES-Leer-Plasmid (A375-Mock) generiert. Das pIRES Plasmid stammt von der Firma Clontech (Palo Alto, California, USA). Die dargestellten Sub-Klone lagen bereits vor Beginn dieser Doktorarbeit im Labor vor (Raisova et al. 2001). Zusätzlich wurden folgende HCT-116 Kolonkarzinom-Zelllinien verwendet: HCT-116 mit Wildtyp Bax, Bak und p53 (ATCC, Rockville, MD, USA), mit Bax-Knockout, mit Bak-Knockdown und mit Bax/Bak-Doppel-Knockdown sowie mit p53-Defizienz. Die dargestellten HCT-116 Subzelllinien lagen bereits vor Beginn dieser Doktorarbeit im Labor vor.

4.1.2 Zellkultivierung

Alle verwendeten Zelllinien wurden bei 37°C mit 5% CO₂ in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre kultiviert. Folgende Medien wurden verwendet: DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (32430, Gibco) mit 4,5 g/l Glucose, 25 mM Hepes, Glutamax, 10% FKS, Penicillin/Streptomycin (Biochrom, Berlin, Germany). Nachstehende Zelllinien wurden in DMEM kultiviert: Mel-2a, Mel-HO, A-375 und MeWo. Die beiden Zelllinien mit einer erworbenen TRAIL-Resistenz, Mel-HO-TS und A-375-TS, wurden ebenfalls in DMEM kultiviert. Diese Zelllinien wurden permanent in Wachstumsmedium mit 5 ng/ml TRAIL zur Aufrechterhaltung der Resistenz kultiviert. Zusätzlich wurden in das DMEM für die Klone 2 ml Geneticin (50mg/ml) und 0,5ml Hygromycin (50mg/ml) gegeben.

4.2 Verwendete agonistische Antikörper

Die Induktion der Todesliganden-vermittelten Apoptose erfolgte mit folgenden Todesliganden bzw. Rezeptoragonisten: KillerTRAIL (soluble, human, rekombinant, ALX-201-073, Alexis, Gruenberg, 20 ng/ml), TNF- α (T-0157, Sigma, Taufkirchen, Germany, 10 ng/ml) und dem agonistischen anti-CD95-Antikörper CH-11 (Beckman Coulter, Krefeld, 100 ng/ml).

4.3 Verwendete Reagenzien

ZVAD-FMK (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; 10 μ M) und Q-VD-OPh (MP Biomedicals, Ohio, USA) wurden als Pancaspasen/Panproteasen-Inhibitor eingesetzt.

Für die unterschiedlichen Strategien der TRAIL-Sensitivierung wurden folgende Kinaseinhibitoren eingesetzt: das Indirubin 8-Rha- β (Kunz et al. 2010), der allosterische IKK-Inhibitor BMS-345541 (N- (1,8-Dimethylimidazo [1,2-a] quinoxalin-4-yl) -1,2-ethanediamine hydrochloride, B-9935, Sigma) und der pan-RAF-Inhibitor L-779-450 (Merck, Darmstadt, Germany) verwendet.

4.4 Molekularbiologische Methoden

4.4.1 Proteinanalytik

Denaturierte Proteine können entsprechend ihrem Molekulargewicht durch die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt werden. Hierbei wandern die denaturierten und negativ geladenen Proteine, erzeugt durch Natriumdodecylsulfat (SDS), im elektrischen Feld zur Anode. Mittels eines Molekulargewichtsstandard (161-0374, Bio-Rad) ist es möglich, die Größe der Proteine zu bestimmen. Die mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine werden auf eine Nitrozellulosemembran (Protran BA83, 0,2 μ m, Whatman, Dassel) transferiert. Auf dieser Membran können sie anschließend indirekt nachgewiesen werden. Dieser Nachweis resultiert aus der spezifischen Bindung von primären Antikörpern, die ihrerseits durch sekundäre Meerrettich-Peroxidase-konjugierte Antikörper gebunden werden. Mittels der Meerrettich-Peroxidase, die in der Lage ist, das ECL-Reagenz (enhanced chemilumineszenz) umzusetzen, kommt es zur Emittierung von Lumineszenzlicht. Dies ermöglicht den Nachweis von Antigenen auf Röntgenfilmen (Amersham Hyperfilm ECL, GE, Buckinghamshire, UK).

4.4.1.1 Herstellung von Proteinextrakten mit Standard-Lysepuffer

Eine exponentiell wachsende Zellkultur mit einer Dichte von 2×10^6 Zellen/6well wurde für die Herstellung von Proteinextrakten verwendet. Prinzipiell erfolgte ein Tag vor der Extraktion der Wechsel des Wachstumsmediums der Zellkultur. Einzelheiten des angewendeten Protokolls für die Erzeugung von Gesamtproteinextrakten, als auch für die Durchführung der Westernblot-Analyse, wurden von Eberle et al. (Eberle et al. 2003) dargestellt.

Protokoll: Für die Analyse wurden die Zellen trypsinisiert und mittels Zentrifugation 5 min bei 1200 rpm geerntet. Um die freigesetzte DNS zu scheren, wurde anschließend das Lysat 5 s mit einem Ultraschall-Homogenisator (Sonoplus, Typ MS-73, Bandelin, Berlin) behandelt. Hinterher erfolgte eine Zentrifugation der Proteinextrakte für 10 min bei 13000 rpm bei 4°C. Die daraus erhaltenen Überstände wurden in neue Eppendorfgefäße überführt. Die Lagerung der Lysate erfolgte bei -20°C. Die Konzentrationsbestimmung wurde mittels BCA-Methode durchgeführt (siehe Abschnitt 4.4.1.4).

4.4.1.2 Herstellung von Proteinextrakten mit Phospho-Lysepuffer

Die Herstellung von Proteinextrakten, die zur Analyse des Phosphorylierungsstatus verschiedener Proteine dienen sollten, erfolgte wie in Punkt 4.4.1.1 beschrieben. Jedoch wurden hierbei die Proteinextrakte mit dem Phospho-Lysepuffer gewonnen.

4.4.1.3 Verwendete Puffer und Reagenzien für Standard- und Phospho-Lysepuffer

Standard-Lysepuffer 10 ml: Tris-HCl 100 µl (1M, pH 7,5, T-1503, Sigma); NaCl 480 µl (3 M, 1.06404, Merck); SDS 500µl (10%, L-4390, Sigma); Nonidet P-40 50 µl (N-3516, Sigma); Protease-Inhibitoren: Aprotinin 36 µl (10%, 10236624, Roche); Leupeptin 100 µl (11017101, Roche); Pepstatin A 100 µl (0,5 mg/ml, 253286, Roche); PMSF 100 µl (100 mM, P-7626, Sigma); EDTA 20 µl (0,5 M, pH 8,0, 8418, Merck); Aqua bidest. 8,5 ml.

Phospho-Lysepuffer 10 ml: Aqua bidest. 9,9 ml; 1 PhosSTOP Phosphatase-Inhibitor Cocktail Tablette (04906845, Roche); Cell Lysis Buffer (10x) (9803, Cell Signaling); 1mM PMSF.

4.4.1.4 Konzentrationsbestimmung mittels BCA-Methode

Die Proteinkonzentration kann durch eine Farbreaktion photometrisch bestimmt werden (BCA Protein Assay, 23225, Thermo Fischer Scientific). Die Biuret-Reaktion, bei der die Amino-Gruppen von Proteinen in alkalischem Medium Cu^{2+} zu Cu^+ reduzieren, liegt dieser Methode zugrunde. Cu^+ reagiert im Anschluss mit Bicinchoninsäure (BCA) zu einem violetten Chelatkomplex, dessen Absorption in einem ELISA-Reader (Dynatech, MR5000) gemessen werden kann (Abb. 37).

Protokoll: In eine Mikrotiterplatte mit Flachboden wurden die zu bestimmenden Proteinextrakte, sowie die Eichlösung in Triplikaten vorgelegt. Für die Ermittlung der Proteinkonzentration wurden die Proteinextrakte (1:10 verd. in PBS, 10 μl) mit 200 μl Reaktionspuffer inkubiert. Der Reaktionspuffer enthielt Lösung A (4 μl) und Lösung B (196 μl). Als Kalibrierlösung wurde eine BSA-Lösung in verschiedenen Konzentrationen verwendet. Die Inkubation der Mikrotiterplatte erfolgte bei 37°C für 30 min und wurde bei 550 nm im ELISA-Reader gemessen. Mittels der bekannten BSA-Konzentrationen konnte die Bestimmung der Proteinmenge der Lysate erfolgen.

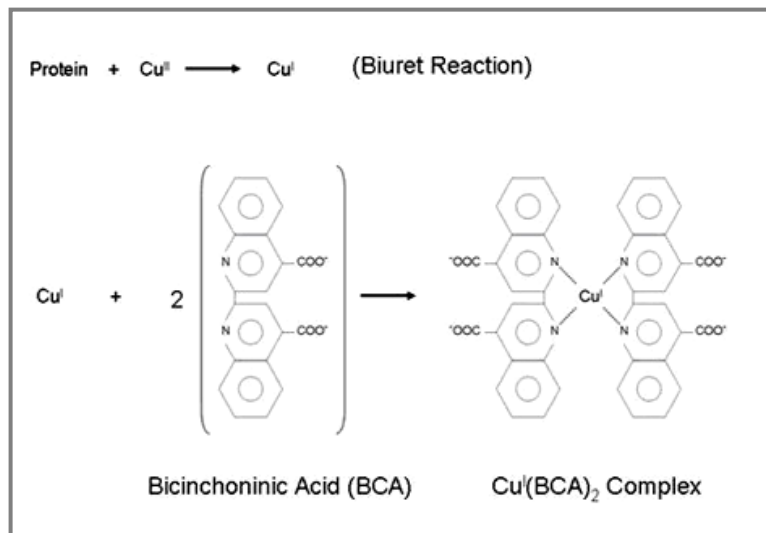


Abb. 37 BCA-Reaktion zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen (Quelle: Biotek)

4.4.1.5 Elektrophorese - Protokoll

Das für die SDS-PAGE verwendete Sammelgel (5%) und Trenngel (12%) wurden mit Hilfe des Elektrophoresesystems (Mini Protean II, BioRad) vor der Elektrophorese hergestellt (King und Laemmli 1971). Zuerst wurde das Trenngel gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde die Überschichtung abgegossen, das Trenngel mit Wasser abgespült und Filterpapier nachgetrocknet. Das

Sammelgel wurde darüber geschichtet. Anschließend wurde ein Gelkamm in das noch flüssige Sammelgel gesteckt. Die Proteinextrakte wurden mit 1-fach Protein-Probenpuffer versetzt und zur Denaturierung 8 min bei 95°C inkubiert. Nach vollständiger Polymerisation wurden die Gelkämme entfernt, die Gele in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt und mit Laufpuffer (1-fach) bedeckt. Um Luftblasen aus den Taschen zu entfernen, wurden diese mit Laufpuffer gespült. Im Anschluss wurden die Taschen mit den Proben beladen. Die Elektrophorese wurde bei 80-160 V durchgeführt, bis die blaue Lauffront das Ende der Gele erreicht hatte.

4.4.1.6 Verwendete Puffer und Reagenzien für die Elektrophorese

Sammelgel (5%ig) 5 ml: Acryl-/Bisacrylamid 0,84 ml (30%, 37,5:1, 161-0158, Bio-Rad); Sammelgelpuffer 2,5 ml; Aqua bidest. 1,6 ml; APS 100 µl (10%, 161-0700, Biorad); TEMED 10 µl (161-0800, Bio-Rad).

Sammelgelpuffer (pH 6,8) 500 ml: Tris-Base 19,7 g (T1503, Sigma); SDS 1,0 g; Aqua bidest. ad 500 ml.

Trenngel (12%ig) 10 ml: Acryl-/Bisacrylamid 4,0 ml (30%, 37,5:1); Trenngelpuffer 5,0 ml; Aqua bidest. 1,0 ml; APS 100 µl (10%); TEMED 10 µl.

Trenngelpuffer (pH 8,8) 500 ml: Tris-Base 38,5 g; Tris-HCl 9,3 g; SDS 1,0 g; Aqua bidest. ad 500 ml. Protein-Probenpuffer (4x) 10ml: Tris-HCl 2,5 ml (1M, pH 6,8; T3253, Sigma); SDS 0,2 g (L-4390, Sigma); Glycerin 4 ml (1.04093, Merck); β-Mercaptoethanol 2 ml (M-7154, Sigma); Bromphenolblau 4 mg (Biorad); Aqua bidest. 1,5 ml. Laufpuffer nach Laemmli (5x) 2 l: Tris-Base 30,4 g; Glycin 144 g (23390, Serva); SDS 10 g; Aqua bidest. ad 2 l.

4.4.1.7 Protein-Transfer-Protokoll

Der Blot, bestehend aus Nitrozellulosemembran und Trenngel, wurde in einer Wet-Blot-Kammer zusammengebaut. Hierbei war das Gel zur Kathode hin ausgerichtet und die Nitrozellulosemembran zeigte zur Anode. An den Außenseiten wurden je zwei Filterpapiere und je ein Schwamm gelegt, um eine gleichmäßige Befeuchtung zu garantieren. Die Blot-Komponenten wurden im Blotpuffer luftblasenfrei aufeinander geschichtet. Die Durchführung des Protein-Transfers erfolgte bei 110 mA für 90 min auf Eis. Zur Bestätigung des Transfers wurden die Proteine auf der Membran mit PonceauS (P-7170, Sigma) angefärbt. Diese Färbung ist reversibel und konnte im Anschluss mit PBS-

Tween wieder vollständig entfärbt werden. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran 1 h bei Raumtemperatur mit Blockierlösung (5%) inkubiert und so die unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran blockiert.

4.4.1.8 Verwendete Puffer und Reagenzien für Protein-Transfer-Protokoll

Transferpuffer (1x) 2 l: Tris-Base 11,64 g; Glycin 4,36 g; SDS 3,7 g; Methanol 400 ml; Aqua bidest. ad 2 l.

Phosphat-buffered Saline (PBS)-Tween (0,05%): PBS Dulbecco 9,55 g (L182-50, Biochrom); Tween20 0,5 ml (P-9416, Sigma); Aqua bidest. ad 1 l.

Blockierlösung (5%): Fettfreie Trockenmilch (*blotting grade*) 5 g (170-6404, Bio-Rad); Phosphate-buffered Saline 0,05% Tween ad 100 ml.

4.4.1.9 Enhanced Chemilumineszenz (ECL)

Die ECL-Lösung für eine Membran, bestehend aus 2 ml Lösung A, 200 µl Lösung B und 0,6 µl H₂O₂ (H-1009, Sigma), wurde kurz vor Verwendung vermischt und auf die Nitrozellulosemembran gegeben. Nach 2 min Inkubationszeit wurde die Membran zwischen zwei Folien luftblasenfrei in eine Filmkassette gelegt. In einer Dunkelkammer wurden die Röntgenfilme für 1 Sekunde bis zu 2 Stunden belichtet. Anhand des Proteinmarkers bzw. entsprechender Positivkontrollen konnte eine Auswertung der Proteinbanden auf dem Röntgenfilm erfolgen.

4.4.1.10 Verwendete Puffer und Reagenzien für ECL

Lösung A: Natriumsalz von Luminol (50 mg, A-4685, Sigma) gelöst in 200 ml 0,1 M Tris/HCl pH 8,6;

Lösung B: p-Hydroxycoumarinsäure (11 mg, C-9008, Sigma) gelöst in 10 ml Dimethylsulfoxid (DMSO, 20385, Serva).

4.4.1.11 Verwendete Antikörper für Westernblot-Analyse

Verwendete primäre Antikörper: AIF (sc-9416, Santa cruz, 1:1000), β-Actin (A5541, Sigma-Aldrich, Seelze, 1:5000), Bad (9292, Cell Signaling, 1:1000), Bak (Y164, Epitomics Inc., Burlingame, CA, USA, 1:200), Bim (sc-11425, Santa Cruz, 1:400), Bax

(N-20, sc-493, Santa Cruz, 1:200), Bcl-2 (sc-509, Santa Cruz, 1:200), Bid (2002, Cell Signaling, 1:1000), Caspase-8 (9746, 1C12, Cell Signaling, 1:1000), Caspase-9 (9502, Cell Signaling, 1:1000), Caspase-3 cleavage products (9661, Asp175, Cell Signaling, 1:1000), Procaspase-3 (9662, Cell Signaling, 1:1000), Cytochrom C (BD Biosciences, San Diego, CA, USA, 1:1,000), GAPDH (6C5, sc-32233, Santa Cruz, 1:1000), I- κ B α (sc-371, Santa Cruz, 1:200), Mcl-1 (sc-12756, Santa Cruz, 1:200), Noxa (2437, ProSci Inc., Poway; CA, USA, 1:200), PARP (9532, Cell Signaling, 1:5000), Puma (1652-1, Epitomics, 1:200), p53 (sc-126, Santa Cruz, 1:500), p65 (sc-109, rabbit), Smac (sc-56230, Santa Cruz, 1:1000), Survivin (D-8, sc-17779, Santa Cruz, 1:200), TRAIL-R1/DR4 (ab8414, Acris Antibodies, Hiddenhausen, 1:500), TRAIL-R2/DR5 (ab8416, Acris Antibodies, 1:500), XIAP (2042, Cell Signaling, 1:1000) und anti-Porin 31 HL (VDAC, 529536, Calbiochem, 1:5000).

Verwendete sekundäre Antikörper: Meerrettich-Peroxidase (Hrp)-markierte Ziege anti-Maus IgG-, Ziege anti-Kaninchen IgG- und Kaninchen anti-Ziege IgG-Antikörper (Dako Cytomation, Hamburg, 1:5000).

4.4.1.12 Herstellung von Zellfraktionierungslysaten

Zur Bestimmung der Cytochrom C-, Smac- und AIF-Freisetzung sowie der mitochondrialen Translokation von Bax und tBid wurden die Mitochondrien und das Zytosol aus den zu analysierenden Zellen mit Hilfe eines Mitochondrien-Fraktionierungskits (ALX-850-276, Alexis, Gruenberg) isoliert.

Protokoll: Subkonfluent gewachsene Zellen wurden 24 h nach Behandlung trypsinisiert und mit PBS auf die Zellzahl $1,5 \times 10^7$ Zellen eingestellt, mit 10 ml kaltem PBS gewaschen und bei 800 g bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Zytosol-Extraktionspuffer (mitgeliefert) resuspendiert und 10 min auf Eis äquilibriert. Anschließend wurden die Zellen in einem 1 ml Glas-Homogenisator mit 40-60 Stößen auf Eis homogenisiert, bis circa 60% der Zellen aufgebrochen waren. Um Zelltrümmer zu entfernen, wurde das Homogenisat mit 800 g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Zur Mitochondrien-Isolierung wurde der Überstand sodann mit 10000 g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Der entstandene Überstand enthielt die zytosolische Fraktion (Cyto) und wurde bei -20°C gelagert. Das Pellet (die mitochondriale Fraktion, Mito), wurde in 100 μ l Mitochondrien-Extraktionspuffer resuspendiert und auch bei -20°C gelagert.

4.5 Zellbiologische Methoden

4.5.1 Durchflusszytometrie

Das Prinzip der Durchflusszytometrie erlaubt es, in einem kurzen Zeitraum eine hohe Zahl einzelner Zellen in Suspension zu analysieren. Bei diesem Prinzip können zunächst ohne weitere Vorbehandlung die Größe, sowie die Granularität des Zytoplasmas von Zellen ermittelt werden. Die Zellen werden mit Überdruck durch eine Messkammer gedrückt. Beim Eintreten in diese werden die Zellen mit einer Trägerflüssigkeit stark beschleunigt, wodurch sich Zellaggregate auflösen. Die Zellen passieren daher vereinzelt den Strahl eines Argon-Lasers der Wellenlänge 488 nm. Aus der Vorwärtsstreuung (FSC) des Lasers ergibt sich die Größe der Zelle sowie die Granularität aus dem im rechten Winkel gestreuten Laserlicht, dem Seitwärtsstreuung (SSC). Über drei weitere Messkanäle (FL1: $\lambda = 530$ nm, FL2: $\lambda = 585$ nm, FL3: $\lambda = 650$ nm) kann parallel zu diesen beiden Parametern Licht verschiedener Wellenlängen detektiert werden, was bei der Analyse von Fluoreszenz-markierten Antikörpern Anwendung findet (Abb. 38).

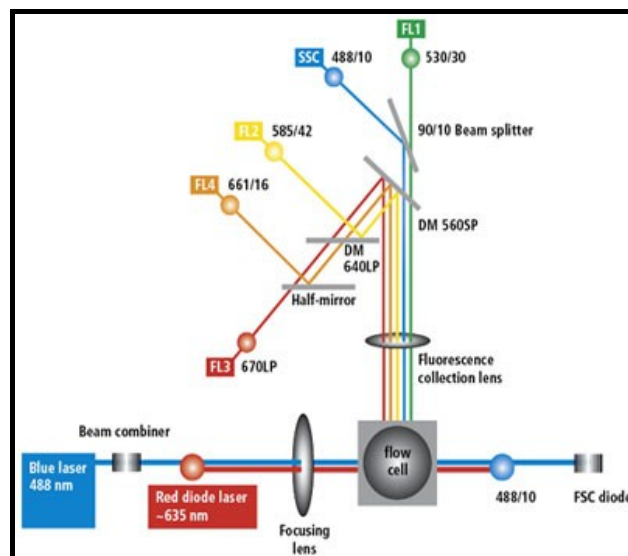


Abb. 38 Optischer Aufbau eines FACSCalibur Durchflusszytometers (<http://www.bdbiosciences.com/instruments/facscalibur/features/index.jsp>).

Dementsprechend können mit diesem Verfahren auch Strukturen auf der Zelloberfläche oder im Zellinneren, nach Permeabilisierung der Zellen, nachgewiesen werden. Die hier dargestellten durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden mit dem FACSCalibur Durchflusszytometer (BD Bioscience) durchgeführt. Die Verarbeitung der Daten erfolgte mit der CellQuest Software (BD Bioscience) oder WinMDI version 2.9 (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA).

4.5.2 Oberflächenexpression - Rezeptoren

Prinzip: Die Oberflächenexpression der zu analysierenden Rezeptoren erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Von den folgenden Rezeptoren wurde die Expression untersucht: TRAIL-R1/DR4 und TRAIL-R2/DR5.

Protokoll: Für den Nachweis der Expression der TRAIL-Rezeptoren (DR4 und DR5) wurden die Zellen trypsinisiert und mittels Zentrifugation 5 min bei 1200 rpm geerntet sowie einmal mit eiskaltem PBS gewaschen und 1×10^6 Zellen/ml in 100 μ l PBS mit 1% BSA resuspendiert und 30 min mit Antikörpern gerichtet gegen TRAIL-R1/DR4 (ALX-804-297, Alexis, HS101, 1:100) oder TRAIL-R2/DR5 (ALX-804-298, Alexis, HS201, 1:100) inkubiert. Als Kontrolle wurde parallel die Bindung eines Isotypkontrollantikörpers (clone MOPC-31C, 278-010, Ancell, Bayport, MN, USA, 1:100) bestimmt. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit einem Phycoerythrin-markierten (PE) Ziege anti-Maus IgG1-Antikörper (ALX-211-201-C050, Alexis, 1:100) für 30 min bei 4°C inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Proben umgehend mit einem FACSCalibur Durchflusszytometer gemessen (FL3, 10000 Zellen).

4.5.3 Blockierungsexperimente - Rezeptoren

Für die Blockierungsexperimente wurden die Zellen mit blockierenden Antikörpern gegen TRAIL-R1/DR4 (Alexis, 1:100) und/oder TRAIL-R2/DR5 (Alexis, 1:100) für 1 h vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit TRAIL und/oder verschiedenen Kinaseinhibitoren. Nach der entsprechenden Inkubationszeit wurde die Quantifizierung der apoptotischen Zellen nach PI-Färbung mittels Durchflusszytometrie durchgeführt.

4.5.4 Nachweismethoden – Apoptose

4.5.4.1 Propidiumjodid-Färbung

Prinzip: Die Quantifizierung des Anteils an apoptotischen und hypodiploiden Zellen, der Sub-G1-Fraktion der Zellen, in Prozent, erfolgte durch Durchflusszytometrie. Bei dieser Methode wird der DNS-Gehalt von Zellen mittels PI-Färbung nachgewiesen (Riccardi und Nicoletti 2006).

Protokoll: Für die Analyse wurden die Zellen trypsinisiert und mittels Zentrifugation 5 min bei 1200 rpm geerntet sowie einmal mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend erfolgte

die Inkubation in einer PI-Färbelösung, bestehend aus PI (40 µg/ml, sc-3541, Santa Cruz), Natriumcitrat (0,1%, S-4641, Sigma), Triton X-100 (0,1%, 37238, Serva), für mindestens 1 h. Nach der Inkubationszeit wurde der DNS-Gehalt der Kerne unter Verwendung des Fluoreszenzdetektors FL-3 durchflusszytometrisch bestimmt. Die Auswertung erfolgte mittels der CellQuest Software oder WinMDI Version 2.9.

4.5.4.2 Bisbenzimid-Färbung

Prinzip: Für die Darstellung der Apoptose auf Einzelzellniveau nutzt man zur Zellkernanfärbung den Farbstoff Bisbenzimid (Hoechst-33342). Der Farbstoff Bisbenzimid interkaliert in die sodann angefärbte DNS, welche als Folge die Chromatin-Kondensation anzeigt. Apoptotische Zellkerne, welche apoptotisch sind, erscheinen nach Bisbenzimid-Färbung stärker angefärbt und von geringerer Größe als gesunde Zellkerne. Zusätzlich können auch fragmentierte Zellkerne mittels dieser Methode nachgewiesen werden, welche für apoptotische Zellen charakteristisch sind.

Protokoll: Subkonfluent gewachsene Zellen wurden 24 h nach Behandlung trypsiniert und mit PBS auf die Zellzahl 50.000/100 µl eingestellt. Mittels einer Cytospin-Zentrifuge wurden 50.000 Zellen auf einen Objektträger zentrifugiert. Nach Lufttrocknung erfolgte die Fixierung der Zellen in 4%-iger Paraformaldehyd-Lösung für 30 min bei 4°C. Anschließend wurden die Objektträger einmal mit PBS gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Inkubation der Zellen für 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln mit Bisbenzimid-Färbelösung (1 µg/ml). Die Zellen wurden wiederholt mit PBS gewaschen und sodann in Mounting-Medium eingebettet. Nach der Trocknung wurden die Zellen im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Zur Analyse der Zellen wurden 500 Zellen pro Ansatz gezählt. Die apoptotischen Zellen wurden als Prozentangabe der Gesamtzellzahl angezeigt.

4.5.5 Nachweismethode - Zytotoxizität

Prinzip: Das Platzen der Zellen durch Schädigung der Plasmamembran (Nekrose) erfolgt vorwiegend durch äußere Einflüsse, wie toxische Reize, mechanische Schädigung oder Strahlung. Hierdurch werden Enzyme, wie die Laktatdehydrogenase (LDH), freigesetzt. Die Aktivität von LDH wird im isolierten Zellüberstand gemessen. Die Freisetzung der LDH wird mit dem Cytotoxicity Detection Kit (LDH) (11644793, Roche Diagnostics) quantifiziert. Die Messung der Aktivität dieses Enzyms erfolgt nach zwei enzymatischen Reaktionen. Im ersten Schritt katalysiert LDH die Oxidation von Lactat zu Pyruvat. Im

gleichen Prozess wird NAD^+ zu NADH/H^+ reduziert. Im zweiten Schritt wird H^+/H auf ein Tetrazoliumsalz übertragen. Dadurch wird das Tetrazoliumsalz zu einem Formazansalz reduziert. Die Aktivität der LDH im Überstand ist proportional zur Menge der Zellen (Abb. 39).

Protokoll: Der Zytotoxizitäts-Test erfolgte parallel zur Propidiumjodid-Färbung mit dem Zellkulturüberstand, von dem 10 μl jeder Probe abgenommen werden. Der Überstand wurde 1:4 mit PBS verdünnt und in eine 96-well-Platte überführt. Nach Zugabe von 40 μl des Reaktionsgemisches erfolgte die Inkubation der Proben bei Raumtemperatur für 30 min im Dunkeln unter Schütteln. Danach erfolgte die photometrische Bestimmung mittels eines ELISA-Readers (Dynatech, MR5000) bei 490 nm. Die Kontrollwerte wurden dem Wert 1 gesetzt und die Werte der Proben hierauf bezogen.

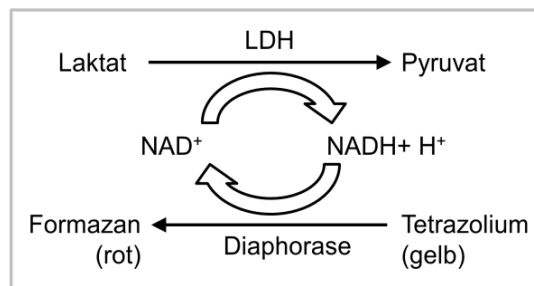


Abb. 39 Cytotoxicity Detection Kit.

Die Aktivität der Laktatdehydrogenase im Zellkulturüberstand katalysiert im ersten Schritt die Oxidation von Laktat zu Pyruvat, wodurch die Reduktion von NAD^+ zu NADH/H^+ erfolgt. Nachfolgend wird H^+/H auf das Tetrazolium-Salz übertragen, wodurch das photometrisch quantifizierbare Formazan-Salz entsteht (Abbildung aus dem Datenblatt).

4.5.6 Wachstumskurven

Prinzip: Für die Erstellung von Wachstumskurven wird die Zelldichte kontinuierlich über eine Echt-Zeit-Zell-Analyse (real-time cell analysis, RTCA, xCELLigence, Roche Diagnostics, Penzberg, Germany) gemessen. Die Technik der Messung ruht auf Mikroelektroden, die auf dem Boden eines jeden Wells einer speziellen 96-Well E-Plate eingegliedert sind. Der Widerstand der Zellen in einem Well steht im direktem Verhältnis zur Zelldichte.

Protokoll: Pro Well wurden 5.000 Zellen ausgesät und nach 24 h in unterschiedlichen Konzentrationen und Kombinationen der Kinaseinhibitoren mit und ohne TRAIL behandelt. Die Messung erfolgte über einen Zeitraum von etwa 80 h in Mess-Intervallen von 15 Minuten.

4.5.7 Nachweismethode - mitochondriales Membranpotential ($\Delta\psi_m$)

Prinzip: Der Nachweis des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\psi_m$) erfolgte mittels des nicht toxischen, kationischen Farbstoffes Tetramethylrhodamine methyl ester perchlorate (TMRM⁺, T5428, Sigma). Der Nachweis basiert auf der Anreicherung des Farbstoffes, auf Basis seiner positiven Ladung, in den negativ geladenen Mitochondrien. Daher zeigt eine verminderte TMRM⁺-Fluoreszenz, gemessen im Durchflusszytometer, eine Störung in der Ladungstrennung von Mitochondrien an.

Protokoll: Die behandelten Zellen wurden trypsinisiert, zweimal mit PBS gewaschen, in 200 μ l TMRM⁺-Lösung (1 μ M) resuspendiert und für 20 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen, in 200 μ l PBS resuspendiert und umgehend im Durchflusszytometer analysiert (FL2, 10000 Zellen). Die Auswertung erfolgte mittels CellQuest Software oder WinMDI version 2.9.

4.5.8 Nachweismethode - Zellvitalität

Die Analyse der Zellviabilität wurde mittels WST-1 Cell Proliferation Assay (11644807, Roche Diagnostics, Mannheim) durchgeführt, welcher die Aktivität von mitochondrialen Enzymen aufzeigt.

Protokoll: In 96-Loch-Platten wurden 5000 Zellen in 200 μ l Medium ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen behandelt und nach weiteren 24 h mit 10 μ l WST-1 Reagenz pro Loch inkubiert, nachdem 100 μ l Medium abgenommen wurde. Die Bestimmung der Umsetzung des Reagenz erfolgte mittels ELISA-Reader bei der Wellenlänge 450nm/690nm. Die Zellvitalität wurde in Prozent, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (Kontrolle = 1), angegeben.

4.5.9 NF- κ B Bindungsnachweis

Die Untersuchung der Kerntranslokation von NF- κ B-Untereinheiten (p65 und p50) erfolgte mit dem NF- κ B-Bindungs-ELISA (43296, TransAM NF- κ B family ELISA Kit, Active Motif, Rixensart, Belgien).

Protokoll: In 6-Loch-Platten wurden 2×10^5 Zellen pro Loch ausplattiert und 24 h nach Aussaat mit Todesliganden +/-BMS-345541 (A-375: 2 μ M; A-375-TS: 5 μ M) für 1 h inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen geerntet und Kernproteinextrakte mit Hilfe eines Nuclear Extraction Kit (40010, Active Motif), entsprechend den Angaben des

Herstellers, hergestellt. Die Proteinkonzentration wurde durch die BCA-Methode ermittelt (siehe Abschnitt 4.4.1.4). Für den NF- κ B-Assay wurden 8 μ g Protein in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte, die mit NF- κ B-Konsensussequenzen beschichtet wurden, gegeben. An diese Sequenzen binden die in den Kernextrakten enthaltenen NF- κ B-Untereinheiten und werden so immobilisiert. Im nächsten Schritt wurden die gebundenen Untereinheiten mittels spezifischer Antikörper markiert. Diese wurden dann durch Meerrettich-Peroxidase gebundene sekundäre Antikörper detektiert. Die Farbreaktion bei Anwesenheit von der gebundenen NF- κ B-Untereinheit konnte mit einem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm ermittelt werden.

4.5.10 Nachweismethode Bax-Aktivierung

Prinzip: Bax liegt im Zytoplasma inaktiv vor. Die Aktivierung von Bax erfordert Konformationsänderungen im Protein. Durch die Konformationsänderung erfolgt sowohl die Translokation zu den Mitochondrien als auch die Insertion von Bax in die äußere Mitochondrienmembran (Dejean et al. 2005). Um zu klären, ob die Behandlung mit TRAIL, den Kinaseinhibitoren oder der Kombination aus beiden zu einer verstärkten Konformationsänderung und somit zur Aktivierung von Bax führt, wurden die behandelten Zellen mit eines aktivierungsspezifischen Antikörpers im Durchflusszytometer analysiert.

Protokoll: In 6-Loch-Platten wurden 2×10^5 Zellen pro Loch ausplattiert und 24 h nach Aussaat mit Todesliganden +/-Kinaseinhibitoren für 1 h bzw. 2 h behandelt. Dazu wurden die Zellen mittels Trypsinierung geerntet, mit PBS gewaschen und anschließend für 30 min mit 4% Paraformaldehyd fixiert. Nach dem Waschen wurden die Zellen für 15 min mit Saponin-Puffer (1% FCS, 0.1% Saponin in PBS) inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit Primärantikörper (Bax-NT, Upstate, Lake Placid, USA, #06-499; Merck, Darmstadt, Germany, #AM04; 1:300) bei 4°C im Dunkeln für 1 h behandelt. Nach einmaligem Waschen erfolgte die Inkubation mit dem Zweitantikörper (Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L)-FITC; Jackson Immuno Research, West Grove, USA) für 30 min im Dunkeln bei 4°C. Zum Schluss wurden die Zellen gewaschen, das Pellet resuspendiert in Saponinpuffer und die Fluoreszenz im Durchflusszytometer (FL-1) detektiert. Die Auswertung erfolgte mittels CellQuest Software oder WinMDI version 2.9.

4.5.11 Nachweismethode Bax-Phosphorylierung mittels Durchflusszytometrie

Prinzip: Bax liegt im Zytoplasma inaktiv vor. Die Aktivierung von Bax erfordert nicht nur Konformationsänderungen im Protein, sondern auch Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen an definierten Positionen. Durch die Phosphorylierungen u.a. durch AKT an Serin-184 von Bax soll eine Inaktivierung von Bax erfolgen (Gardai et al. 2004; Renault und Manon 2011; Wang et al. 2010a). Eine Phosphorylierung von Bax an Threonin-167 soll eine Aktivierung von Bax zur Folge haben (Kim et al. 2006a). Um klarzustellen, ob die Behandlung mit TRAIL, den Kinaseinhibitoren oder der Kombination aus beiden zu einer verstärkten Phosphorylierung oder Dephosphorylierung von Bax führt, wurden die behandelten Zellen mit phosphospezifischen Antikörpern im Durchflusszytometer analysiert.

Protokoll: Das Protokoll wurde wie in 4.5.10 beschrieben durchgeführt. Als Primärantikörper wurden für die Analyse der Serin184-Phosphorylierung Bax (Phospho-Ser184; A8297, 1:300) und für die Threonin167-Phosphorylierung (Phospho-Thr-167; A0773, 1:300) der Firma Assay bioTech (Sunnyvale, USA) verwendet. Als Kontrolle, um den Einfluss der Inhibitoren zu analysieren, wurde der Primärantikörper Bax (N-20, sc-493, Santa Cruz, 1:300) verwendet.

4.6 Statistische Auswertung

Bei der Analyse der Messwerte wurden die Mittelwerte aus mindestens drei Messungen und die dazugehörigen Standardabweichungen angegeben. Die Signifikanz wurde mit Hilfe der Student'schen *t*-Verteilung bestimmt. Die Mittelwerte, Standardabweichungen und die Student'sche *t*-Verteilung wurden mit dem Programm Microsoft Excel berechnet. Als statistisch signifikant wurden Werte mit einem *p*-Wert < 0,05 [*] bewertet und als hoch signifikant, wenn der *p*-Wert < 0,01 [**] war.

Literaturverzeichnis

- Ai,Z.H., L.H.Yin, X.R.Zhou, Y.Zhu, D.M.Zhu, Y.H.Yu, and Y.J.Feng. 2006. "Inhibition of survivin reduces cell proliferation and induces apoptosis in human endometrial cancer." *Cancer*. 107:746-756.
- Altieri,D.C. 2010. "Survivin and IAP proteins in cell-death mechanisms." *Biochemical Journal*. 430:199-205.
- Ammann,J.U., C.Haag, H.Kasperczyk, K.M.Debatin, and S.Fulda. 2009. "Sensitization of neuroblastoma cells for TRAIL-induced apoptosis by NF-kappa B inhibition." *International Journal of Cancer*. 124:1301-1311.
- Ashkenazi,A. 2002. "Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily." *Nat.Rev.Cancer*. 2:420-430.
- Balch,C.M., A.C.Buzaid, S.J.Soong, M.B.Atkins, N.Cascinelli, D.G.Coit, I.D.Fleming, J.E.Gershenwald, A.Houghton, J.M.Kirkwood, K.M.McMasters, M.F.Mihm, D.L.Morton, D.S.Reintgen, M.I.Ross, A.Sober, J.A.Thompson, and J.F.Thompson. 2001. "Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma." *Journal of Clinical Oncology*. 19:3635-3648.
- Bao,Q. and Y.Shi. 2007. "Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases." *Cell Death and Differentiation*. 14:56-65.
- Baud,V. and M.Karin. 2009. "OPINION Is NF-kappa B a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls." *Nature Reviews Drug Discovery*. 8:33-40.
- Bean,M.A., B.R.Bloom, R.B.Herberman, L.J.Old, H.F.Oettgen, G.Klein, and W.D.Terry. 1975. "Cell-Mediated Cytotoxicity for Bladder Carcinoma - Evaluation of A Workshop." *Cancer Research*. 35:2902-2913.
- Belyanskaya,L.L., T.M.Marti, S.Hopkins-Donaldson, S.Kurtz, E.Felley-Bosco, and R.A.Stahel. 2007. "Human agonistic TRAIL receptor antibodies Mapatumumab and Lexatumumab induce apoptosis in malignant mesothelioma and act synergistically with cisplatin." *Molecular Cancer*. 6.
- Ben Neriah,Y. and M.Karin. 2011. "Inflammation meets cancer, with NF-kappa B as the matchmaker." *Nature Immunology*. 12:715-723.
- Besser,M.J., R.Shapira-Frommer, A.J.Treves, D.Zippel, O.Itzhaki, L.HersHKovitz, D.Levy, A.Kubi, E.Hovav, N.Chermoshniuk, B.Shalmon, I.Hardan, R.Catane, G.Markel, S.Apter, A.Ben Nun, I.Kuchuk, A.Shimoni, A.Nagler, and J.Schachter. 2010. "Clinical Responses in a Phase II Study Using Adoptive Transfer of Short-term Cultured Tumor Infiltration Lymphocytes in Metastatic Melanoma Patients." *Clinical Cancer Research*. 16:2646-2655.
- Birnbaum,M.J., R.J.Clem, and L.K.Miller. 1994. "An Apoptosis-Inhibiting Gene from A Nuclear Polyhedrosis-Virus Encoding A Polypeptide with Cys/His Sequence Motif." *Journal of Virology*. 68:2521-2528.

- Blencke,S., B.Zech, O.Engkvist, Z.Greff, L.Orfi, Z.Horvath, G.Keri, A.Ullrich, and H.Daub. 2004. "Characterization of a conserved structural determinant controlling protein kinase sensitivity to selective inhibitors." *Chemistry & Biology*. 11:691-701.
- Bodur,C., O.Kutuk, T.Tezil, and H.Basaga. 2012. "Inactivation of Bcl-2 through I kappa B kinase (IKK)-dependent phosphorylation mediates apoptosis upon exposure to 4-hydroxynonenal (HNE)." *Journal of Cellular Physiology*. 227:3556-3565.
- Bollag,G., P.Hirth, J.Tsai, J.Z.Zhang, P.N.Ibrahim, H.N.Cho, W.Spevak, C.Zhang, Y.Zhang, G.Habets, E.Burton, B.Wong, G.Tsang, B.L.West, B.Powell, R.Shellooe, A.Marimuthu, H.Nguyen, K.Y.J.Zhang, D.R.Artis, J.Schlessinger, F.Su, B.Higgins, R.Iyer, K.D'Andrea, A.Koehler, M.Stumm, P.S.Lin, R.J.Lee, J.Grippio, I.Puzanov, K.B.Kim, A.Ribas, G.A.McArthur, J.A.Sosman, P.B.Chapman, K.T.Flaherty, X.W.Xu, K.L.Nathanson, and K.Nolop. 2010. "Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma." *Nature*. 467:596-599.
- Bollrath,J. and F.R.Greten. 2009. "IKK/NF-kappa B and STAT3 pathways: central signalling hubs in inflammation-mediated tumour promotion and metastasis." *Embo Reports*. 10:1314-1319.
- Bossi,G. and A.Sacchi. 2007. "Restoration of wild-type p53 function in human cancer: relevance for tumor therapy." *Head Neck*. 29:272-284.
- Bratton,S.B., J.Lewis, M.Butterworth, C.Duckett, and G.M.Cohen. 2002. "XIAP inhibition of caspase-3 preserves its association with the Apaf-1 apoptosome and prevents CD95-and Bax-induced apoptosis." *Cell Death and Differentiation*. 9:881-892.
- Bratton,S.B. and G.S.Salvesen. 2010. "Regulation of the Apaf-1-caspase-9 apoptosome." *Journal of Cell Science*. 123:3209-3214.
- Brenner,D., P.H.Krammer, and R.Arnold. 2008. "Concepts of activated T cell death." *Critical Reviews in Oncology Hematology*. 66:52-64.
- Breslow,A. 1978. "Measurements of Tumor Thickness." *Human Pathology*. 18:238-239.
- Broaddus,V.C., T.B.Dansen, K.S.Abayasiriwardana, S.M.Wilson, A.J.Finch, L.B.Swigart, A.E.Hunt, and G.I.Evan. 2005. "Bid mediates apoptotic synergy between tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and DNA damage." *Journal of Biological Chemistry*. 280:12486-12493.
- Bruggen,J., J.Fogh, and C.Sorg. 1981. "Tumor Production in the Nude-Mouse, Fibrinolytic-Activity and Cross-Reactivity with Anti-Melanoma Sera of Various Human-Tumor Cell-Lines." *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 102:141-152.
- Bulavin,D.V. and A.J.Fornace, Jr. 2004. "p38 MAP kinase's emerging role as a tumor suppressor." *Adv.Cancer Res*. 92:95-118.

- Burke, J.R., M.A. Pattoli, K.R. Gregor, P.J. Brassil, J.F. MacMaster, K.W. McIntyre, X.X. Yang, V.S. Iotzova, W. Clarke, J. Strnad, Y.P. Qiu, and F.C. Zusi. 2003. "BMS-345541 is a highly selective inhibitor of I kappa B kinase that binds at an allosteric site of the enzyme and blocks NF-kappa B-dependent transcription in mice." *Journal of Biological Chemistry*. 278:1450-1456.
- Carter, B.Z., D.H. Mak, W.D. Schober, M.F. Dietrich, C. Pinilla, L.T. Vassilev, J.C. Reed, and M. Andreeff. 2008. "Triptolide sensitizes AML cells to TRAIL-induced apoptosis via decrease of XIAP and p53-mediated increase of DR5." *Blood*. 111:3742-3750.
- Cartlidge, R.A., G.R. Thomas, S. Cagnol, K.A. Jong, S.A. Molton, A.J. Finch, and M. McMahon. 2008. "Oncogenic BRAF(V600E) inhibits BIM expression to promote melanoma cell survival." *Pigment Cell & Melanoma Research*. 21:534-544.
- Chai, J.J., C.Y. Du, J.W. Wu, S. Kyin, X.D. Wang, and Y.G. Shi. 2000. "Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO." *Nature*. 406:855-862.
- Chapman, P.B., A. Hauschild, C. Robert, J.B. Haanen, P. Ascierto, J. Larkin, R. Dummer, C. Garbe, A. Testori, M. Maio, D. Hogg, P. Lorigan, C. Lebbe, T. Jouary, D. Schadendorf, A. Ribas, S.J. O'Day, J.A. Sosman, J.M. Kirkwood, A.M.M. Eggermont, B. Dreno, K. Nolop, J. Li, B. Nelson, J. Hou, R.J. Lee, K.T. Flaherty, and G.A. McArthur. 2011. "Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation." *New England Journal of Medicine*. 364:2507-2516.
- Chen, L., S.N. Willis, A. Wei, B.J. Smith, J.I. Fletcher, M.G. Hinds, P.M. Colman, C.L. Day, J.M. Adams, and D.C.S. Huang. 2005. "Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function." *Molecular Cell*. 17:393-403.
- Chipuk, J.E. and D.R. Green. 2008. "How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization?" *Trends Cell Biol.* 18:157-164.
- Chipuk, J.E., T. Moldoveanu, F. Llambi, M.J. Parsons, and D.R. Green. 2010. "The BCL-2 Family Reunion." *Molecular Cell*. 37:299-310.
- Clark, W.H. 1991. "Tumor Progression and the Nature of Cancer." *British Journal of Cancer*. 64:631-644.
- Clark, W.H., D.E. Elder, D. Guerry, M.N. Epstein, M.H. Greene, and M. Vanhorn. 1984. "A Study of Tumor Progression - the Precursor Lesions of Superficial Spreading and Nodular Melanoma." *Human Pathology*. 15:1147-1165.
- Cuadrado, A. and A.R. Nebreda. 2010. "Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling." *Biochem.J.* 429:403-417.
- Daniel, P.T., K. Schulze-Osthoff, C. Belka, and D. Guner. 2003. "Guardians of cell death: the Bcl-2 family proteins." *Essays Biochem.* 39:73-88.
- Daub, H., K. Specht, and A. Ullrich. 2004. "Strategies to overcome resistance to targeted protein kinase inhibitors." *Nature Reviews Drug Discovery*. 3:1001-1010.

- Davar,D., A.A.Tarhini, and J.M.Kirkwood. 2012. "Adjuvant Therapy for Melanoma." *Cancer Journal*. 18:192-202.
- Davies,H., G.R.Bignell, C.Cox, P.Stephens, S.Edkins, S.Clegg, J.Teague, H.Woffendin, M.J.Garnett, W.Bottomley, N.Davis, N.Dicks, R.Ewing, Y.Floyd, K.Gray, S.Hall, R.Hawes, J.Hughes, V.Kosmidou, A.Menzies, C.Mould, A.Parker, C.Stevens, S.Watt, S.Hooper, R.Wilson, H.Jayatilake, B.A.Gusterson, C.Cooper, J.Shipley, D.Hargrave, K.Pritchard-Jones, N.Maitland, G.Chenevix-Trench, G.J.Riggins, D.D.Bigner, G.Palmieri, A.Cossu, A.Flanagan, A.Nicholson, J.W.C.Ho, S.Y.Leung, S.T.Yuen, B.L.Weber, H.F.Siegler, T.L.Darrow, H.Paterson, R.Marais, C.J.Marshall, R.Wooster, M.R.Stratton, and P.A.Futreal. 2002. "Mutations of the BRAF gene in human cancer." *Nature*. 417:949-954.
- Degterev,A. and J.Yuan. 2008. "Expansion and evolution of cell death programmes." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 9:378-390.
- Dejean,L.M., S.Martinez-Caballero, L.Guo, C.Hughes, O.Teijido, T.Ducet, F.Ichas, S.J.Korsmeyer, B.Antonsson, E.A.Jonas, and K.W.Kinnally. 2005. "Oligomeric Bax is a component of the putative cytochrome c release channel MAC, mitochondrial apoptosis-induced channel." *Molecular Biology of the Cell*. 16:2424-2432.
- Deng,H.B., G.X.Mao, J.P.Zhang, Z.Wang, and D.D.Li. 2010. "IKK antagonizes activation-induced cell death of CD4(+) T cells in aged mice via inhibition of JNK activation." *Molecular Immunology*. 48:287-293.
- Di Pietro,R. and G.Zauli. 2004. "Emerging non-apoptotic functions of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)/Apo2L." *J.Cell Physiol*. 201:331-340.
- Dimberg,Y., C.K.Anderson, R.Camidge, K.Behbakht, A.Thorburn, and H.L.Ford. 2012. "On the TRAIL to successful cancer therapy? Predicting and counteracting resistance against TRAIL-based therapeutics." *Oncogene*. doi: 10.1038/onc.2012.164.
- Dogan,T., G.S.Harms, M.Hekman, C.Karreman, T.K.Oberoi, E.S.Alnemri, U.R.Rapp, and K.Rajalingam. 2008. "X-linked and cellular IAPs modulate the stability of C-RAF kinase and cell motility." *Nature Cell Biology*. 10:1447-1455.
- Druker,B.J. and N.B.Lydon. 2000. "Lessons learned from the development of an Abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia." *Journal of Clinical Investigation*. 105:3-7.
- Eberle,J., L.F.Fecker, T.Forschner, C.Ulrich, J.Rowert-Huber, and E.Stockfleth. 2007a. "Apoptosis pathways as promising targets for skin cancer therapy." *Br.J.Dermatol*. 156 Suppl 3:18-24.
- Eberle,J., L.F.Fecker, A.M.Hossini, T.Wieder, P.T.Daniel, C.E.Orfanos, and C.C.Geilen. 2003. "CD95/Fas signaling in human melanoma cells: conditional expression of CD95L/FasL overcomes the intrinsic apoptosis resistance of malignant melanoma and inhibits growth and progression of human melanoma xenotransplants." *Oncogene*. 22:9131-9141.

- Eberle, J., B.M.Kurbanov, A.M.Hossini, U.Trefzer, and L.F.Fecker. 2007b. "Overcoming apoptosis deficiency of melanoma-hope for new therapeutic approaches." *Drug Resist.Updat.* 10:218-234.
- Eckhart, L., J.Ban, H.Fischer, and E.Tschachler. 2000. "Caspase-14: Analysis of gene structure and mRNA expression during keratinocyte differentiation." *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 277:655-659.
- Ehrhardt, H., S.Fulda, I.Schmid, J.Hiscott, K.M.Debatin, and I.Jeremias. 2003. "TRAIL induced survival and proliferation in cancer cells resistant towards TRAIL-induced apoptosis mediated by NF-kappa B." *Oncogene.* 22:3842-3852.
- Falschlehner, C., C.H.Emmerich, B.Gerlach, and H.Walczak. 2007. "TRAIL signalling: Decisions between life and death." *International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 39:1462-1475.
- Falschlehner, C., T.M.Ganten, R.Koschny, U.Schaefer, and H.Walczak. 2009. "TRAIL and other TRAIL receptor agonists as novel cancer therapeutics." *Adv.Exp.Med.Biol.* 647:195-206.
- Fas, S.C., S.Baumann, J.Y.Zhu, M.Giaisi, M.K.Treiber, U.Mahlknecht, P.H.Krammer, and M.Li-Weber. 2006. "Wogonin sensitizes resistant malignant cells to TNFalpha- and TRAIL-induced apoptosis." *Blood.* 108:3700-3706.
- Fink, S.L. and B.T.Cookson. 2005. "Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: Mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells." *Infection and Immunity.* 73:1907-1916.
- Fischer, U., R.U.Janicke, and K.Schulze-Osthoff. 2003. "Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates." *Cell Death and Differentiation.* 10:76-100.
- Flaherty, K.T., I.Puzanov, K.B.Kim, A.Ribas, G.A.McArthur, J.A.Sosman, P.J.O'Dwyer, R.J.Lee, J.F.Grippio, K.Nolop, and P.B.Chapman. 2010. "Inhibition of Mutated, Activated BRAF in Metastatic Melanoma." *New England Journal of Medicine.* 363:809-819.
- Franco, A.V., X.D.Zhang, E.Van Berkel, J.E.Sanders, X.Y.Zhang, W.D.Thomas, T.Nguyen, and P.Hersey. 2001. "The role of NF-kappa B in TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis of melanoma cells." *Journal of Immunology.* 166:5337-5345.
- Fuentes-Prior, P. and G.S.Salvesen. 2004. "The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition." *Biochemical Journal.* 384:201-232.
- Fulda, S. 2009. "Cell death in hematological tumors." *Apoptosis.* 14:409-423.
- Fulda, S. and K.M.Debatin. 2006. "Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy." *Oncogene.* 25:4798-4811.
- Fulda, S. and D.Vucic. 2012. "Targeting IAP proteins for therapeutic intervention in cancer." *Nature Reviews Drug Discovery.* 11:109-124.

- Fulda,S., W.Wick, M.Weller, and K.M.Debatin. 2002. "Smac agonists sensitize for Apo2L/TRAIL- or anticancer drug-induced apoptosis and induce regression of malignant glioma in vivo." *Nature Medicine*. 8:808-815.
- Galban,S., G.F.Brady, and C.S.Duckett. 2008. "Caspases and IAPs: A Dance of Death Ensures Cell Survival." *Molecular Cell*. 32:462-463.
- Galban,S. and C.S.Duckett. 2010. "XIAP as a ubiquitin ligase in cellular signaling." *Cell Death and Differentiation*. 17:54-60.
- Garbe,C. and U.Leiter. 2009. "Melanoma epidemiology and trends." *Clinics in Dermatology*. 27:3-9.
- Gardai,S.J., D.A.Hildeman, S.K.Frankel, B.B.Whitlock, S.C.Frasch, N.Borregaard, P.Marrack, D.L.Bratton, and P.M.Henson. 2004. "Phosphorylation of Bax Ser(184) by Akt regulates its activity and apoptosis in neutrophils." *Journal of Biological Chemistry*. 279:21085-21095.
- Giard,D.J., S.A.Aaronson, G.J.Todaro, P.Arnstein, J.H.Kersey, H.Dosik, and W.P.Parks. 1973. "In-Vitro Cultivation of Human Tumors - Establishment of Cell Lines Derived from A Series of Solid Tumors." *Journal of the National Cancer Institute*. 51:1417-1423.
- Gillissen,B., J.Wendt, A.Richter, A.Richter, A.Muer, T.Overkamp, N.Gebhardt, R.Preissner, C.Belka, B.Dorken, and P.T.Daniel. 2010. "Endogenous Bak inhibitors Mcl-1 and Bcl-x(L): differential impact on TRAIL resistance in Bax-deficient carcinoma." *Journal of Cell Biology*. 188:851-862.
- Gogvadze,V., S.Orrenius, and B.Zhivotovsky. 2009. "Mitochondria as targets for chemotherapy." *Apoptosis*. 14:624-640.
- Goldin,L.R. and O.Landgren. 2009. "Autoimmunity and lymphomagenesis." *International Journal of Cancer*. 124:1497-1502.
- Green,D.R. and G.Kroemer. 2004. "The pathophysiology of mitochondrial cell death." *Science*. 305:626-629.
- Grotzer,M.A., A.Eggert, T.J.Zuzak, A.J.Janss, S.Marwaha, B.R.Wiewrodt, N.Ikegaki, G.M.Brodeur, and P.C.Phillips. 2000. "Resistance to TRAIL-induced apoptosis in primitive neuroectodermal brain tumor cells correlates with a loss of caspase-8 expression." *Oncogene*. 19:4604-4610.
- Guicciardi,M.E. and G.J.Gores. 2009. "Life and death by death receptors." *FASEB J*. 23:1625-1637.
- Gupta,S., G.E.N.Kass, E.Szegezdi, and B.Joseph. 2009. "The mitochondrial death pathway: a promising therapeutic target in diseases." *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 13:1004-1033.

- Gyrd-Hansen, M., M. Darding, M. Miasari, M. M. Santoro, L. Zender, W. Xue, T. Tenev, P. C. A. da Fonseca, M. Zvelebil, J. M. Bujnicki, S. Lowe, J. Silke, and P. Meier. 2008. "IAPs contain an evolutionarily conserved ubiquitin-binding domain that regulates NF-kappa B as well as cell survival and oncogenesis." *Nature Cell Biology*. 10:1309-U130.
- Gyrd-Hansen, M. and P. Meier. 2010. "IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF-kappa B, inflammation and cancer (vol 10, pg 561, 2010)." *Nature Reviews Cancer*. 10:890.
- Harada, C. and S. Grant. 2003. "Apoptosis regulators." *Rev Clin Exp Hematol*. 7:117-118.
- Hauschild, A., J. J. Grob, L. V. Demidov, T. Jouary, R. Gutzmer, M. Millward, P. Rutkowski, C. U. Blank, W. H. Miller, E. Kaempgen, S. Martin-Algarra, B. Karaszewska, C. Mauch, V. Chiarion-Sileni, A. M. Martin, S. Swann, P. Haney, B. Mirakhur, M. E. Guckert, V. Goodman, and P. B. Chapman. 2012. "Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial." *Lancet*. 380:358-365.
- Heidorn, S. J., C. Milagre, S. Whittaker, A. Nourry, I. Niculescu-Duvas, N. Dhomen, J. Hussain, J. S. Reis-Filho, C. J. Springer, C. Pritchard, and R. Marais. 2010. "Kinase-Dead BRAF and Oncogenic RAS Cooperate to Drive Tumor Progression through CRAF." *Cell*. 140:209-221.
- Hengartner, M. O. 2000. "The biochemistry of apoptosis." *Nature*. 407:770-776.
- Herbst, R. S., S. G. Eckhardt, R. Kurzrock, S. Ebbinghaus, P. J. O'Dwyer, M. S. Gordon, W. Novotny, M. A. Goldwasser, T. M. Tohny, B. L. Lum, A. Ashkenazi, A. M. Jubb, and D. S. Mendelson. 2010. "Phase I Dose-Escalation Study of Recombinant Human Apo2L/TRAIL, a Dual Proapoptotic Receptor Agonist, in Patients With Advanced Cancer." *Journal of Clinical Oncology*. 28:2839-2846.
- Hinds, M. G., R. S. Norton, D. L. Vaux, and C. L. Day. 1999. "Solution structure of a baculoviral inhibitor of apoptosis (IAP) repeat." *Nature Structural Biology*. 6:648-651.
- Hinz, S., A. Trauzold, L. Boenicke, C. Sandberg, S. Beckmann, E. Bayer, H. Walczak, H. Kalthoff, and H. Ungefroren. 2000. "Bcl-X-L protects pancreatic adenocarcinoma cells against CD95- and TRAIL-receptor-mediated apoptosis." *Oncogene*. 19:5477-5486.
- Hodi, F. S., S. J. O'Day, D. F. McDermott, R. W. Weber, J. A. Sosman, J. B. Haanen, R. Gonzalez, C. Robert, D. Schadendorf, J. C. Hassel, W. Akerley, A. J. M. van den Eertwegh, J. Lutzky, P. Lorigan, J. M. Vaubel, G. P. Linette, D. Hogg, C. H. Ottensmeier, C. Lebbe, C. Peschel, I. Quirt, J. I. Clark, J. D. Wolchok, J. S. Weber, J. Tian, M. J. Yellin, G. M. Nichol, A. Hoos, and W. J. Urba. 2010. "Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma." *New England Journal of Medicine*. 363:711-723.

- Hoessel,R., S.Leclerc, J.A.Endicott, M.E.Nobel, A.Lawrie, P.Tunnah, M.Leost, E.Damiens, D.Marie, D.Marko, E.Niederberger, W.Tang, G.Eisenbrand, and L.Meijer. 1999. "Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases." *Nat.Cell Biol.* 1:60-67.
- Holzmann,B., J.M.Lehmann, H.W.L.Zieglerheitbrock, I.Funke, and G.Riethmuller. 1988. "Glycoprotein P3.58, Associated with Tumor Progression in Malignant-Melanoma, Is A Novel Leukocyte Activation Antigen." *International Journal of Cancer.* 41:542-547.
- Hornle,M., N.Peters, B.Thayaparasingham, H.Vorsmann, H.Kashkar, and D.Kulms. 2011. "Caspase-3 cleaves XIAP in a positive feedback loop to sensitize melanoma cells to TRAIL-induced apoptosis." *Oncogene.* 30:575-587.
- Hossini,A.M. and J.Eberle. 2008. "Apoptosis induction by Bcl-2 proteins independent of the BH3 domain." *Biochem.Pharmacol.* 76:1612-1619.
- Hu,W.H., H.Johnson, and H.B.Shu. 1999. "Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptors signal NF-kappa B and JNK activation and apoptosis through distinct pathways." *Journal of Biological Chemistry.* 274:30603-30610.
- Huwe,A., R.Mazitschek, and A.Giannis. 2003. "Small molecules as inhibitors of cyclin-dependent kinases." *Angewandte Chemie-International Edition.* 42:2122-2138.
- Igney,F.H. and P.H.Krammer. 2002. "Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack." *Journal of Leukocyte Biology.* 71:907-920.
- Inamdar,G.S., S.V.Madhunapantula, and G.P.Robertson. 2010. "Targeting the MAPK pathway in melanoma: Why some approaches succeed and other fail." *Biochemical Pharmacology.* 80:624-637.
- Ivanov,V.N., M.A.Partridge, G.E.Johnson, S.X.L.Huang, H.N.Zhou, and T.K.Hei. 2008. "Resveratrol sensitizes melanomas to TRAIL through modulation of antiapoptotic gene expression." *Experimental Cell Research.* 314:1163-1176.
- Jani,T.S., J.DeVecchio, T.Mazumdar, A.Agyeman, and J.A.Houghton. 2010. "Inhibition of NF-kappa B Signaling by Quinacrine Is Cytotoxic to Human Colon Carcinoma Cell Lines and Is Synergistic in Combination with Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand (TRAIL) or Oxaliplatin." *Journal of Biological Chemistry.* 285:19162-19172.
- Jansen,B., V.Wacheck, E.Heere-Ress, H.Schlagbauer-Wadl, C.Hoeller, T.Lucas, M.Hoermann, U.Hollenstein, K.Wolff, and H.Pehamberger. 2000. "Chemosensitisation of malignant melanoma by BCL2 antisense therapy." *Lancet.* 356:1728-1733.
- Jiang,C.C., L.H.Chen, S.Gillespie, K.A.Kiejda, N.Mhaidat, Y.F.Wang, R.Thorne, X.D.Zhang, and P.Hersey. 2007. "Tunicamycin sensitizes human melanoma cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by up-regulation of TRAIL-R2 via the unfolded protein response." *Cancer Research.* 67:5880-5888.

- Jiang,P., W.Du, K.Heese, and M.Wu. 2006. "The Bad guy cooperates with good cop p53: Bad is transcriptionally up-regulated by p53 and forms a Bad/p53 complex at the mitochondria to induce apoptosis." *Mol.Cell Biol.* 26:9071-9082.
- Jin,Z.Y., E.R.McDonald, D.T.Dicker, and W.S.El Deiry. 2004. "Deficient tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) death receptor transport to the cell surface in human colon cancer cells selected for resistance to TRAIL-induced apoptosis." *Journal of Biological Chemistry.* 279:35829-35839.
- Joseph,E.W., C.A.Pratilas, P.I.Poulikakos, M.Tadi, W.Q.Wang, B.S.Taylor, E.Halilovic, Y.Persaud, F.Xing, A.Viale, J.Tsai, P.B.Chapman, G.Bollag, D.B.Solit, and N.Rosen. 2010. "The RAF inhibitor PLX4032 inhibits ERK signaling and tumor cell proliferation in a V600E BRAF-selective manner." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 107:14903-14908.
- Jost,P.J., S.Grabow, D.Gray, M.D.McKenzie, U.Nachbur, D.C.S.Huang, P.Bouillet, H.E.Thomas, C.Borner, J.Silke, A.Strasser, and T.Kaufmann. 2009. "XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis." *Nature.* 460:1035-U128.
- Karin,M. 2006. "NF-kappa B and cancer: Mechanisms and targets." *Molecular Carcinogenesis.* 45:355-361.
- Karin,M. 2009. "NF-kappa B as a Critical Link Between Inflammation and Cancer." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.* 1.
- Kawasaki,H., D.C.Altieri, C.D.Lu, M.Toyoda, T.Tenjo, and N.Tanigawa. 1998. "Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer." *Cancer Research.* 58:5071-5074.
- Keilholz,U. and M.E.Gore. 2002. "Biochemotherapy for advanced melanoma." *Seminars in Oncology.* 29:456-461.
- Kelley,S.K. and A.Ashkenazi. 2004. "Targeting death receptors in cancer with Apo2L/TRAIL." *Curr.Opin.Pharmacol.* 4:333-339.
- Kelley,S.K., L.A.Harris, D.Xie, L.Deforge, K.Totpal, J.Bussiere, and J.A.Fox. 2001. "Preclinical studies to predict the disposition of Apo2L/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in humans: Characterization of in vivo efficacy, pharmacokinetics, and safety." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 299:31-38.
- Kelly,P.N. and A.Strasser. 2011. "The role of Bcl-2 and its pro-survival relatives in tumourigenesis and cancer therapy." *Cell Death and Differentiation.* 18:1414-1424.
- Kerr,J.F.R. 1995. "Neglected Opportunities in Apoptosis Research." *Trends in Cell Biology.* 5:55-57.
- Khoshnan,A., J.Ko, S.Tescu, P.Brundin, and P.H.Patterson. 2009. "IKK alpha and IKK beta Regulation of DNA Damage-Induced Cleavage of Huntingtin." *Plos One.* 4.

- Kim,B.J., S.W.Ryu, and B.J.Song. 2006a. "JNK- and p38 kinase-mediated phosphorylation of Bax leads to its activation and mitochondrial translocation and to apoptosis of human hepatoma HepG2 cells." *Journal of Biological Chemistry*. 281:21256-21265.
- Kim,H., M.Rafiuddin-Shah, H.C.Tu, J.R.Jeffers, G.P.Zambetti, J.J.D.Hsieh, and E.H.Y.Cheng. 2006b. "Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies." *Nature Cell Biology*. 8:1348-1U19.
- Kim,K.H., M.J.Fisher, S.Q.Xu, and W.S.El Deiry. 2000. "Molecular determinants of response to TRAIL in killing of normal and cancer cells." *Clinical Cancer Research*. 6:335-346.
- Kim,R., M.Emi, and K.Tanabe. 2005. "Cancer cell immune escape and tumor progression by exploitation of anti-inflammatory and pro-inflammatory responses." *Cancer Biology & Therapy*. 4:924-933.
- King,J. and U.K.Laemmli. 1971. "Polypeptides of Tail Fibres of Bacteriophage T4." *Journal of Molecular Biology*. 62:465-&.
- Krammer,P.H., R.Arnold, and I.N.Lavrik. 2007. "Life and death in peripheral T cells." *Nat.Rev.Immunol*. 7:532-542.
- Kudchadkar,R., K.H.T.Paraiso, and K.S.M.Smalley. 2012. "Targeting Mutant BRAF in Melanoma Current Status and Future Development of Combination Therapy Strategies." *Cancer Journal*. 18:124-131.
- Kunz,M., K.M.Driller, M.Hein, S.Libnow, I.Hohensee, R.Ramer, B.Hinz, A.Berger, J.Eberle, and P.Langer. 2010. "Synthesis of thia-analogous indirubin N-Glycosides and their influence on melanoma cell growth and apoptosis." *ChemMedChem*. 5:534-539.
- Kurbanov,B.M., L.F.Fecker, C.C.Geilen, W.Sterry, and J.Eberle. 2007. "Resistance of melanoma cells to TRAIL does not result from upregulation of antiapoptotic proteins by NF-kappaB but is related to downregulation of initiator caspases and DR4." *Oncogene*. 26:3364-3377.
- Kurbanov,B.M., C.C.Geilen, L.F.Fecker, C.E.Orfanos, and J.Eberle. 2005. "Efficient TRAIL-R1/DR4-mediated apoptosis in melanoma cells by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)." *J.Invest Dermatol*. 125:1010-1019.
- Labrinidis,A., P.Diamond, S.Martin, S.Hay, V.Liapis, I.Zinonos, N.A.Sims, G.J.Atkins, C.Vincent, V.Ponomarev, D.M.Findlay, A.C.Zannettino, and A.Evdokiou. 2009. "Apo2L/TRAIL inhibits tumor growth and bone destruction in a murine model of multiple myeloma." *Clin.Cancer Res*. 15:1998-2009.
- LaCasse,E.C., D.J.Mahoney, H.H.Cheung, S.Plenchette, S.Baird, and R.G.Korneluk. 2008. "IAP-targeted therapies for cancer." *Oncogene*. 27:6252-6275.
- Lavrik,I., A.Golks, and P.H.Krammer. 2005. "Death receptor signaling." *Journal of Cell Science*. 118:265-267.

- LeBlanc, H.N. and A.Ashkenazi. 2003. "Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors." *Cell Death and Differentiation*. 10:66-75.
- Lee, d.Y., M.W.Lee, H.J.Lee, Y.H.Noh, S.C.Park, M.Y.Lee, K.Y.Kim, W.B.Lee, and S.S.Kim. 2006. "ERK1/2 activation attenuates TRAIL-induced apoptosis through the regulation of mitochondria-dependent pathway." *Toxicol In Vitro*. 20:816-823.
- Lee, J.W., M.J.Moon, H.Y.Min, H.J.Chung, E.J.Park, H.J.Park, J.Y.Hong, Y.C.Kim, and S.K.Lee. 2005. "Induction of apoptosis by a novel indirubin-5-nitro-3'-monoxime, a CDK inhibitor, in human lung cancer cells." *Bioorg.Med.Chem.Lett*. 15:3948-3952.
- Leist, M. and M.Jaattela. 2001. "Four deaths and a funeral: From caspases to alternative mechanisms." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2:589-598.
- Li, H.L., H.Zhu, C.J.Xu, and J.Y.Yuan. 1998. "Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis." *Cell*. 94:491-501.
- Liabakk, N.B., A.Sundan, S.Torp, P.Aukrust, S.S.Froland, and T.Espevik. 2002. "Development, characterization and use of monoclonal antibodies against sTRAIL: measurement of sTRAIL by ELISA." *Journal of Immunological Methods*. 259:119-128.
- Lockshin, R.A. and C.M.Williams. 1964. "Programmed Cell Death .2. Endocrine Potentiation of the Breakdown of the Intersegmental Muscles of Silkworms." *Journal of Insect Physiology*. 10:643-649.
- Lopez-Guerra, M., G.Roue, P.Perez-Galan, R.Alonso, N.Villamor, E.Montserrat, E.Campo, and D.Colomer. 2009. "p53 Activity and ZAP-70 Status Predict the Sensitivity of Chronic Lymphocytic Leukemia Cells to the Selective I kappa B Kinase Inhibitor BMS-345541." *Clinical Cancer Research*. 15:2767-2776.
- Lu, C. and W.El Deiry. 2009. "Targeting p53 for enhanced radio- and chemo-sensitivity." *Apoptosis*. 14:597-606.
- Lu, M., S.C.Lin, Y.H.Huang, Y.J.Kang, R.Rich, Y.C.Lo, D.Myszka, J.H.Han, and H.Wu. 2007. "XIAP induces NF-kappa B activation via the BIR1/TAB1 interaction and BIR1 dimerization." *Molecular Cell*. 26:689-702.
- Luo, X., I.Budihardjo, H.Zou, C.Slaughter, and X.D.Wang. 1998. "Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors." *Cell*. 94:481-490.
- MacFarlane, M. 2003. "TRAIL-induced signalling and apoptosis." *Toxicology Letters*. 139:89-97.
- Mahalingam, D., E.Szegezdi, M.Keane, S.de Jong, and A.Samali. 2009. "TRAIL receptor signalling and modulation: Are we on the right TRAIL?" *Cancer Treatment Reviews*. 35:280-288.
- Mannhold, R., S.Fulda, and E.Carosati. 2010. "IAP antagonists: promising candidates for cancer therapy." *Drug Discovery Today*. 15:210-219.

- Maurer,G., B.Tarkowski, and M.Baccarini. 2011. "Raf kinases in cancer-roles and therapeutic opportunities." *Oncogene*. 30:3477-3488.
- McCubrey,J.A., L.S.Steelman, W.H.Chappell, S.L.Abrams, E.W.T.Wong, F.Chang, B.Lehmann, D.M.Terrian, M.Milella, A.Tafari, F.Stivala, M.Libra, J.Basecke, C.Evangelisti, A.M.Martelli, and R.A.Franklin. 2007. "Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance." *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*. 1773:1263-1284.
- Mehrotra,S., L.R.Languino, C.M.Raskett, A.M.Mercurio, T.Dohi, and D.C.Altieri. 2010. "IAP Regulation of Metastasis." *Cancer Cell*. 17:53-64.
- Meijer,L., A.L.Skaltsounis, P.Magiatis, P.Polychronopoulos, M.Knockaert, M.Leost, X.P.Ryan, C.A.Vonica, A.Brivanlou, R.Dajani, C.Crovace, C.Tarricone, A.Musacchio, S.M.Roe, L.Pearl, and P.Greengard. 2003. "GSK-3-selective inhibitors derived from Tyrian purple indirubins." *Chem.Biol*. 10:1255-1266.
- Melnikova,I. and J.Golden. 2004. "Targeting protein kinases." *Nature Reviews Drug Discovery*. 3:993-994.
- Micheau,O., S.Lens, O.Gaide, K.Alevizopoulos, and J.Tschopp. 2001. "NF-kappa B signals induce the expression of c-FLIP." *Molecular and Cellular Biology*. 21:5299-5305.
- Min,H., G.S.Ghatnekar, A.V.Ghatnekar, M.You, M.Bu, X.Guo, S.Bu, B.Shen, and Q.Huang. 2011. "2-Methoxyestradiol induced bax phosphorylation and apoptosis in human retinoblastoma cells via p38 MAPK activation." *Mol Carcinog*. doi: 10.1002/mc.20825.
- Mitsiades,C.S., S.P.Treon, N.Mitsiades, Y.Shima, P.Richardson, R.Schlossman, T.Hideshima, and K.C.Anderson. 2001. "TRAIL/Apo2L ligand selectively induces apoptosis and overcomes drug resistance in multiple myeloma: therapeutic applications." *Blood*. 98:795-804.
- Naka,T., K.Sugamura, B.L.Hylander, M.B.Widmer, Y.M.Rustum, and E.A.Repasky. 2002. "Effects of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand alone and in combination with chemotherapeutic agents on patients' colon tumors grown in SCID mice." *Cancer Research*. 62:5800-5806.
- Nazarian,R., H.B.Shi, Q.Wang, X.J.Kong, R.C.Koya, H.Lee, Z.G.Chen, M.K.Lee, N.Attar, H.Sazegar, T.Chodon, S.F.Nelson, G.McArthur, J.A.Sosman, A.Ribas, and R.S.Lo. 2010. "Melanomas acquire resistance toB-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation." *Nature*. 468:973-U377.
- Nicotera,P., O.H.Petersen, G.Melino, and A.Verkhatsky. 2007. "Janus a god with two faces: death and survival utilise same mechanisms conserved by evolution." *Cell Death and Differentiation*. 14:1235-1236.
- Oikonomou,E., M.Koc, V.Sourkova, L.Andera, and A.Pintzas. 2011. "Selective BRAFV600E Inhibitor PLX4720, Requires TRAIL Assistance to Overcome Oncogenic PIK3CA Resistance." *Plos One*. 6.

- Perabo,F.G., C.Frossler, G.Landwehrs, D.H.Schmidt, A.von Rucker, A.Wirger, and S.C.Muller. 2006. "Indirubin-3'-monoxime, a CDK inhibitor induces growth inhibition and apoptosis-independent up-regulation of survivin in transitional cell cancer." *Anticancer Res.* 26:2129-2135.
- Perabo,F.G., G.Landwehrs, C.Frossler, D.H.Schmidt, and S.C.Mueller. 2009. "Antiproliferative and apoptosis inducing effects of indirubin-3'-monoxime in renal cell cancer cells." *Urol.Oncol.*
- Pinon,J.D., V.Labi, A.Egle, and A.Villunger. 2008. "Bmf and Bmf in tissue homeostasis and malignant disease." *Oncogene.* 27:S41-S52.
- Pitti,R.M., M.A.Marsters, S.Ruppert, C.J.Donahue, A.Moore, and A.Ashkenazi. 1996. "Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family." *Journal of Biological Chemistry.* 271:12687-12690.
- Pop,C. and G.S.Salvesen. 2009. "Human Caspases: Activation, Specificity, and Regulation." *Journal of Biological Chemistry.* 284:21777-21781.
- Prien,O. 2006. "The gatekeeper: Friend or foe in identifying the next generation of kinase inhibitors." *Chemmedchem.* 1:1195-1196.
- Qu,J.L., M.F.Zhao, Y.E.Teng, Y.Zhang, K.Z.Hou, Y.H.Jiang, X.H.Yang, H.Shang, X.J.Qu, and Y.P.Liu. 2011. "Interferon-alpha sensitizes human gastric cancer cells to TRAIL-induced apoptosis via activation of the c-Cbl-dependent MAPK/ERK pathway." *Cancer Biology & Therapy.* 12:494-502.
- Quast,S., A.Berger, N.Buttstädt, K.Friebe, R.Schönherr, and J.Eberle. 2012. "General sensitization of melanoma cells for TRAIL-induced apoptosis by the potassium channel inhibitor TRAM-34 depends on release of SMAC." *Plos One.* in press.
- Raisova,M., M.Bektas, T.Wieder, P.Daniel, J.Eberle, C.E.Orfanos, and C.C.Geilen. 2000. "Resistance to CD95/Fas-induced and ceramide-mediated apoptosis of human melanoma cells is caused by a defective mitochondrial cytochrome c release." *FEBS Lett.* 473:27-32.
- Raisova,M., A.M.Hossini, J.Eberle, C.Riebeling, T.Wieder, I.Sturm, P.T.Daniel, C.E.Orfanos, and C.C.Geilen. 2001. "The Bax/Bcl-2 ratio determines the susceptibility of human melanoma cells to CD95/Fas-mediated apoptosis." *J.Invest Dermatol.* 117:333-340.
- Renault,T.T. and S.Manon. 2011. "Bax: Addressed to kill." *Biochimie.* 93:1379-1391.
- Restifo,N.P., M.E.Dudley, and S.A.Rosenberg. 2012. "Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response." *Nature Reviews Immunology.* 12:269-281.
- Ribas,J., K.Bettayeb, Y.Ferandin, M.Knockaert, X.Garrofe-Ochoa, F.Totze, C.Schachtele, J.Mester, P.Polychronopoulos, P.Magiatis, A.L.Skaltounis, J.Boix, and L.Meijer. 2006. "7-Bromoindirubin-3'-oxime induces caspase-independent cell death." *Oncogene.* 25:6304-6318.
- Riccardi,C. and I.Nicoletti. 2006. "Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry." *Nature Protocols.* 1:1458-1461.

- Riedl, S.J. and Y. Shi. 2004. "Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis." *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5:897-907.
- Rini, B.I. 2006. "Sorafenib." *Expert Opinion on Pharmacotherapy.* 7:453-461.
- Robbins, P.F., R.A. Morgan, S.A. Feldman, J.C. Yang, R.M. Sherry, M.E. Dudley, J.R. Wunderlich, A.V. Nahvi, L.J. Helman, C.L. Mackall, U.S. Kammula, M.S. Hughes, N.P. Restifo, M. Raffeld, C.C.R. Lee, C.L. Levy, Y.F. Li, M. El Gamil, S.L. Schwarz, C. Laurencot, and S.A. Rosenberg. 2011. "Tumor Regression in Patients With Metastatic Synovial Cell Sarcoma and Melanoma Using Genetically Engineered Lymphocytes Reactive With NY-ESO-1." *Journal of Clinical Oncology.* 29:917-924.
- Robert, C., L. Thomas, I. Bondarenko, S. O'Day, J. Weber, C. Garbe, C. Lebbe, J.F. Baurain, A. Testori, J.J. Grob, N. Davidson, J. Richards, M. Maio, A. Hauschild, W.H. Miller, P. Gascon, M. Lotem, K. Harmankaya, R. Ibrahim, S. Francis, T.T. Chen, R. Humphrey, A. Hoos, and J.D. Wolchok. 2011. "Ipilimumab plus Dacarbazine for Previously Untreated Metastatic Melanoma." *New England Journal of Medicine.* 364:2517-2526.
- Rosenberg, S.A., B.S. Packard, P.M. Aebersold, D. Solomon, S.L. Topalian, S.T. Toy, P. Simon, M.T. Lotze, J.C. Yang, C.A. Seipp, C. Simpson, C. Carter, S. Bock, D. Schwartzentruber, J.P. Wei, and D.E. White. 1988. "Use of Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Interleukin-2 in the Immunotherapy of Patients with Metastatic Melanoma - A Preliminary-Report." *New England Journal of Medicine.* 319:1676-1680.
- Rosenberg, S.A., J.C. Yang, R.M. Sherry, U.S. Kammula, M.S. Hughes, G.Q. Phan, D.E. Citrin, N.P. Restifo, P.F. Robbins, J.R. Wunderlich, K.E. Morton, C.M. Laurencot, S.M. Steinberg, D.E. White, and M.E. Dudley. 2011. "Durable Complete Responses in Heavily Pretreated Patients with Metastatic Melanoma Using T-Cell Transfer Immunotherapy." *Clinical Cancer Research.* 17:4550-4557.
- Rothe, M., M.G. Pan, W.J. Henzel, T.M. Ayres, and D.V. Goeddel. 1995. "The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral-inhibitor of apoptosis proteins." *Cell.* 83:1243-1252.
- Roy, S., C.I. Bayly, Y. Gareau, V.M. Houtzager, S. Kargman, S.L. Keen, K. Rowland, I.M. Seiden, N.A. Thornberry, and D.W. Nicholson. 2001. "Maintenance of caspase-3 proenzyme dormancy by an intrinsic "safety catch" regulatory tripeptide." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98:6132-6137.
- Sachsenmaier, C. 2001. "Targeting protein kinases for tumor therapy." *Onkologie.* 24:346-355.
- Sarela, A.I., N. Scott, J. Ramsdale, A.F. Markham, and P.J. Guillou. 2001. "Immunohistochemical detection of the anti-apoptosis protein, survivin, predicts survival after curative resection of stage II colorectal carcinomas." *Annals of Surgical Oncology.* 8:305-310.
- Satyamoorthy, K. and M. Herlyn. 2002. "Cellular and molecular biology of human melanoma." *Cancer Biol. Ther.* 1:14-17.

- Schmidt,R.F. and F.Lang. 2007. *Physiologie des Menschen*.
- Schön,M., B.G.Wienrich, S.Kneitz, H.Sennefelder, K.Amschler, V.Vohringer, O.Weber, T.Stiewe, K.Ziegelbauer, and M.P.Schön. 2008. "KINK-1, a novel small-molecule inhibitor of IKK beta, and the susceptibility of melanoma cells to antitumoral treatment." *Journal of the National Cancer Institute*. 100:862-875.
- Scott,F.L., B.Stec, C.Pop, M.K.Dobaczewska, J.J.Lee, E.Monosov, H.Robinson, G.S.Salvesen, R.Schwarzenbacher, and S.J.Riedl. 2009. "The Fas-FADD death domain complex structure unravels signalling by receptor clustering." *Nature*. 457:1019-1022.
- Sethi,G., K.S.Ahn, S.K.Sandur, X.Lin, M.M.Chaturvedi, and B.B.Aggarwal. 2006. "Indirubin enhances tumor necrosis factor-induced apoptosis through modulation of nuclear factor-kappa B signaling pathway." *J.Biol.Chem*. 281:23425-23435.
- Shelton,J.G., P.W.Moye, L.S.Steelman, W.L.Blalock, J.T.Lee, R.A.Franklin, M.McMahon, and J.A.McCubrey. 2003. "Differential effects of kinase cascade inhibitors on neoplastic and cytokine-mediated cell proliferation." *Leukemia*. 17:1765-1782.
- Shen,Z.J., S.Esnault, A.Schinzl, C.Borner, and J.S.Malter. 2009. "The peptidyl-prolyl isomerase Pin1 facilitates cytokine-induced survival of eosinophils by suppressing Bax activation." *Nature Immunology*. 10:257-265.
- Sheridan,J.P., S.A.Marsters, R.M.Pitti, A.Gurney, M.Skubatch, D.Baldwin, L.Ramakrishnan, C.L.Gray, K.Baker, W.I.Wood, A.D.Goddard, P.Godowski, and A.Ashkenazi. 1997. "Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors." *Science*. 277:818-821.
- Shi,J. and H.M.Shen. 2008. "Critical role of Bid and Bax in indirubin-3'-monoxime-induced apoptosis in human cancer cells." *Biochem.Pharmacol*. 75:1729-1742.
- Sinicrope,F.A., R.C.Penington, and M.T.Xi. 2004. "Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis is inhibited by Bcl-2 but restored by the small molecule Bcl-2 inhibitor, HA 14-1, in human colon cancer cells." *Clinical Cancer Research*. 10:8284-8292.
- Soengas,M.S. and S.W.Lowe. 2003. "Apoptosis and melanoma chemoresistance." *Oncogene*. 22:3138-3151.
- Song,D., Y.Gao, R.Wang, D.Liu, L.Zhao, and Y.Jing. 2010. "Downregulation of c-FLIP, XIAP and Mcl-1 protein as well as depletion of reduced glutathione contribute to the apoptosis induction of glycyrrhetic acid derivatives in leukemia cells." *Cancer Biol.Ther*. 9:96-108.
- Soria,J.C., Z.Mark, P.Zatloukal, B.Szima, I.Albert, E.Juhasz, J.L.Pujol, J.Kozlowski, N.Baker, D.Smethurst, Y.J.Hei, A.Ashkenazi, H.Stern, L.Amler, Y.Pan, and F.Blackhall. 2011. "Randomized Phase II Study of Dulanermin in Combination With Paclitaxel, Carboplatin, and Bevacizumab in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer." *Journal of Clinical Oncology*. 29:4442-4451.

- Sosman, J.A., K.B. Kim, L. Schuchter, R. Gonzalez, A.C. Pavlick, J.S. Weber, G.A. McArthur, T.E. Hutson, S.J. Moschos, K.T. Flaherty, P. Hersey, R. Kefford, D. Lawrence, I. Puzanov, K.D. Lewis, R.K. Amaravadi, B. Chmielowski, H.J. Lawrence, Y. Shyr, F. Ye, J. Li, K.B. Nolop, R.J. Lee, A.K. Joe, and A. Ribas. 2012. "Survival in BRAF V600-Mutant Advanced Melanoma Treated with Vemurafenib." *New England Journal of Medicine*. 366:707-714.
- Stennicke, H.R., C.A. Ryan, and G.S. Salvesen. 2002. "Reprieval from execution: the molecular basis of caspase inhibition." *Trends in Biochemical Sciences*. 27:94-101.
- Stennicke, H.R. and G.S. Salvesen. 2000. "Caspase assays." *Apoptosis*. 322:91-100.
- Su, F., W.D. Bradley, Q.Q. Wang, H. Yang, L.Z. Xu, B. Higgins, K. Kolinsky, K. Packman, M.J. Kim, K. Trunzer, R.J. Lee, K. Schostack, J. Carter, T. Albert, S. Germer, J. Rosinski, M. Martin, M.E. Simcox, B. Lestini, D. Heimbrook, and G. Bollag. 2012. "Resistance to Selective BRAF Inhibition Can Be Mediated by Modest Upstream Pathway Activation." *Cancer Research*. 72:969-978.
- Sung, B., B. Park, V.R. Yadav, and B.B. Aggarwal. 2010. "Celastrol, a triterpene, enhances TRAIL-induced apoptosis through the down-regulation of cell survival proteins and up-regulation of death receptors." *J. Biol. Chem*. 285:11498-11507.
- Tait, S.W.G. and D.R. Green. 2010. "Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 11:621-632.
- Tanaka, K., S. Iwamoto, G. Gon, T. Nohara, M. Iwamoto, and N. Tanigawa. 2000. "Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas." *Clinical Cancer Research*. 6:127-134.
- Taylor, R.C., S.P. Cullen, and S.J. Martin. 2008. "Apoptosis: controlled demolition at the cellular level." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 9:231-241.
- Tinel, A. and J. Tschopp. 2004. "The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress." *Science*. 304:843-846.
- Tran, S.E.F., T.H. Holmstrom, M. Ahonen, V.M. Kahari, and J.E. Eriksson. 2001. "MAPK/ERK overrides the apoptotic signaling from Fas, TNF, and TRAIL receptors." *Journal of Biological Chemistry*. 276:16484-16490.
- Tsujimoto, Y., L.R. Finger, J. Yunis, P.C. Nowell, and C.M. Croce. 1984. "Cloning of the Chromosome Breakpoint of Neoplastic B-Cells with the T(14-18) Chromosome-Translocation." *Science*. 226:1097-1099.
- Uren, A.G., M. Pakusch, C.J. Hawkins, K.L. Puls, and D.L. Vaux. 1996. "Cloning and expression of apoptosis inhibitory protein homologs that function to inhibit apoptosis and/or bind tumor necrosis factor receptor-associated factors." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93:4974-4978.
- Vaculova, A., V. Kaminsky, E. Jalalvand, O. Surova, and B. Zhivotovsky. 2010. "Doxorubicin and etoposide sensitize small cell lung carcinoma cells expressing caspase-8 to TRAIL." *Molecular Cancer*. 9.

- Vallabhapurapu, S. and M. Karin. 2009. "Regulation and Function of NF-kappa B Transcription Factors in the Immune System." *Annual Review of Immunology*. 27:693-733.
- Vandenabeele, P., L. Galluzzi, T. Vanden Berghe, and G. Kroemer. 2010. "Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 11:700-714.
- Vermeulen, K., D. R. Van Bockstaele, and Z. N. Berneman. 2005. "Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer." *Annals of Hematology*. 84:627-639.
- Vulpetti, A. and R. Bosetti. 2004. "Sequence and structural analysis of kinase ATP pocket residues." *Farmacology*. 59:759-765.
- Wacheck, V., C. Krepler, S. Strommer, E. Heere-Ress, R. Klem, H. Pehamberger, H. G. Eichler, and B. Jansen. 2002. "Antitumor effect of G3139 Bcl-2 antisense oligonucleotide is independent of its immune stimulation by CpG motifs in SCID mice." *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 12:359-367.
- Walczak, H., R. E. Miller, K. Ariail, B. Gliniak, T. S. Griffith, M. Kubin, W. Chin, J. Jones, A. Woodward, T. Le, C. Smith, P. Smolak, R. G. Goodwin, C. T. Rauch, J. C. L. Schuh, and D. H. Lynch. 1999. "Tumoricidal activity of tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand in vivo." *Nature Medicine*. 5:157-163.
- Wang, Q. H., S. Y. Sun, F. Khuri, W. J. Curran, and X. M. Deng. 2010a. "Mono- or Double-Site Phosphorylation Distinctly Regulates the Proapoptotic Function of Bax." *Plos One*. 5.
- Wang, S. and W. S. El Deiry. 2003. "TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors." *Oncogene*. 22:8628-8633.
- Wang, S., W. Ren, J. Liu, G. Lahat, K. Torres, G. Lopez, A. J. Lazar, A. Hayes-Jordan, K. Liu, J. Bankson, J. D. Hazle, and D. Lev. 2010b. "TRAIL and doxorubicin combination induces proapoptotic and antiangiogenic effects in soft tissue sarcoma in vivo." *Clin. Cancer Res.* 16:2591-2604.
- Wellbrock, C., M. Karasarides, and R. Marais. 2004. "The RAF proteins take centre stage." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 5:875-885.
- Weng, C. J., Y. Li, D. Xu, Y. Shi, and H. Tang. 2005. "Specific cleavage of Mcl-1 by caspase-3 in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in Jurkat leukemia T cells." *Journal of Biological Chemistry*. 280:10491-10500.
- Wiley, S. R., K. Schooley, P. J. Smolak, W. S. Din, C. P. Huang, J. K. Nicholl, G. R. Sutherland, T. D. Smith, C. Rauch, C. A. Smith, and R. G. Goodwin. 1995. "Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis." *Immunity*. 3:673-682.
- Wright, C. W. and C. S. Duckett. 2005. "Reawakening the cellular death program in neoplasia through the therapeutic blockade of IAP function." *Journal of Clinical Investigation*. 115:2673-2678.

- Wu,X.X. and Y.Takehi. 2009. "Enhancement of Lexatumumab-Induced Apoptosis in Human Solid Cancer Cells by Cisplatin in Caspase-Dependent Manner." *Clinical Cancer Research*. 15:2039-2047.
- Xin,M.G. and X.M.Deng. 2005. "Nicotine inactivation of the proapoptotic function of Bax through phosphorylation." *Journal of Biological Chemistry*. 280:10781-10789.
- Xu,L.P., S.P.Yin, S.Banerjee, F.Sarkar, and K.B.Reddy. 2011. "Enhanced Anticancer Effect of the Combination of Cisplatin and TRAIL in Triple-Negative Breast Tumor Cells." *Molecular Cancer Therapeutics*. 10:550-557.
- Yang,J.M., K.I.Amiri, J.R.Burke, J.A.Schmid, and A.Richmond. 2006. "BMS-345541 targets inhibitor of kappa B kinase and induces apoptosis in melanoma: Involvement of nuclear factor kappa B and mitochondria pathways." *Clinical Cancer Research*. 12:950-960.
- Yang,J.M., S.Zaja-Milatovic, Y.M.Thu, F.Lee, R.Smykia, and A.Richmond. 2009. "Molecular determinants of melanoma malignancy: selecting targets for improved efficacy of chemotherapy." *Molecular Cancer Therapeutics*. 8:636-647.
- Yang,Y.L. and X.M.Li. 2000. "The IAP family: endogenous caspase inhibitors with multiple biological activities." *Cell Res*. 10:169-177.
- Youle,R.J. and A.Strasser. 2008. "The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 9:47-59.
- Younes,A., J.M.Vose, A.D.Zelenetz, M.R.Smith, H.A.Burris, S.M.Ansell, J.Klein, W.Halpern, R.Miceli, E.Kumm, N.L.Fox, and M.S.Czuczman. 2010. "A Phase 1b/2 trial of mapatumumab in patients with relapsed/refractory non-Hodgkin's lymphoma." *British Journal of Cancer*. 103:1783-1787.
- Zhang,L. and B.Fang. 2005. "Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in cancer." *Cancer Gene Ther*. 12:228-237.
- Zhang,X.D., J.J.Wu, S.Gillespie, J.Borrow, and P.Hersey. 2006. "Human melanoma cells selected for resistance to apoptosis by prolonged exposure to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand are more vulnerable to necrotic cell death induced by cisplatin." *Clinical Cancer Research*. 12:1355-1364.
- Zhang,Y. and B.Zhang. 2008. "TRAIL resistance of breast cancer cells is associated with constitutive endocytosis of death receptors 4 and 5." *Mol.Cancer Res*. 6:1861-1871.
- Zhen,Y., V.Sorensen, Y.Jin, Z.Suo, and A.Wiedlocha. 2007. "Indirubin-3'-monoxime inhibits autophosphorylation of FGFR1 and stimulates ERK1/2 activity via p38 MAPK." *Oncogene*. 26:6372-6385.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
$\Delta\psi_m$	Mitochondriales Membranpotential
A	
A1/Bfl-1	Bcl-2-related protein A1
ABTS	2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulfonate (6)] diammoniumsalz
AIF	Apoptosis inducing factor
APS	Ammoniumperoxodisulfate
ATCC	American Type Culture Collection
ATL	Adult T cell lymphoma/leukemia
ATP	Adenosine triphosphate
APC	Antigen-präsentierende Zelle
B	
bp (kb)	Base pair (kilo base pair)
Bad	Bcl-2 antagonist of cell death
Bak	Bcl-2 homologous antagonist killer
Bax	Bcl-2 associated protein X
BCA	Bicinchonin acid
Bcl-2	B-cell lymphoma/leukemia-2
Bcl-x _L	Bcl-2-like 1 long
Bcl-x _S	Bcl-2-like 1 short
Bcl-x _{AK}	Bcl-2-like 1 atypical killer
BIR	Baculoviral inhibitor of apoptosis repeat
Bid	BH3-interacting domain death agonist
Bik/Nbk	Bcl-2 interacting killer/Natural born killer
Bim	Bcl-2 interagting mediator of cell death
BSA	Bovine serum albumine
C	
Cyt c	Cytochrom C
CARD	Caspase recruitment domain
Caspase	Cysteine-aspartate specific protease
CD	Cluster of differentiation
CD95L	CD95 ligand
DNS	Complementary DNS
c-FLIP	Cellular FLICE inhibitory protein
cIAP	Cellular inhibitor of apoptosis protein
CrmA	Cytokine response modifier A
CTCL	Cutaneous T cell lymphoma
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CTLA	Cytotoxic T-lymphocyte antigen
D	
DcR	TRAIL Decoy receptor
DD	Death domain
DED	Death effector domain
DIABLO	Direct IAP binding protein with low pI
DISC	Death inducing signalling complex
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNS	Desoxynukleinsäure
DR	Death receptor

DTT	Dithiothreitol
E	
ECL	Enhanced chemiluminescence
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
F	
FCS	Fetal calf serum
FSC	Forward scatter
FITC	Fluoresceinisothiocyanat)
G	
g	Gramm
GAPDH	Glucose-6Phosphate Dehydrogenase
H	
h	Stunde
HRP	Horseradishperoxidase
HtrA2/Omi	High temperature requirement A2
I	
ICAD	Inhibitor of caspase-activated DNase
Ig	Immunglobulin
IKK	I κ B kinase
I- κ B	Inhibitor of κ B proteins
IFN- α	Interferon alpha
IL-2	Interleukin-2
J	
JNK	C-Jun N-terminal kinase
K	
kDa	Kilodalton
L	
LDH	Laktat-Dehydrogenase
M	
min	Minute
mAb	Monoclonal antibody
Mcl-1	Myeloid cell leukaemia sequence-1
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEKK	MAPK/ERK kinase kinase
MOMP	Mitochondrial outer membrane permeabilization
N	
Nbk/Bik	Natural born killer/Bcl-2-interakting killer
NIK	NF- κ B-inducing kinase
NF- κ B	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
Noxa	angelehnt an das griechische Wort schädlich
N-Terminus	Amino-Terminus
O	
P	
pH	Potentia hydrogenii
p35	p35 - baculovirus encoded inhibitor
PARP	Poly ADP ribose polymerases
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	Phosphat-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin

PI	Propidium iodide
PIDD	p53-induced protein with death domain
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluoride
Puma	p53 upregulated modulator of apoptosis
Q	
R	
RAIDD	RIP-associated ICH-1/CED-3-homologous protein with death domain
RAF	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
Ras	Rat sarcoma
RIP	Receptor-interacting protein
RING	Really interesting new gene
RGP	Radial Growth Phase
RNA	Ribonucleic acid
RT	Raumtemperatur
Rpm	Rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RTCA	Echtzeit-Zellanalyse (real-time cell analysis)
S	
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SD	Standardabweichung
Ser	Serin
Smac	Second mitochondria-derived activator of caspases
SSC	Side scatter
SSM	Superfiziell spreitendes Melanom
T	
tBid	Truncated Bid
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TM	Transmembrane domain
TNF- α	Tumour necrosis factor alpha
TNF-R	TNF receptor
TRADD	TNFR1-associated death domain protein
TRAF	TNFR-associated factor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRAIL-R	TRAIL receptor
Tris	Tris-[hydroxymethyl]amino-methane
TBS	Tris-buffered saline
U	
UBA	Ubiquitin-associated
V	
VDAC	Voltage dependent anion channel
W	
WST	Water Soluble Tetrazolium
X	
XIAP	X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein
Y	
Z	
z.B.	zum Beispiel

Publikationsliste

Aus dieser Arbeit sind folgende Publikationen hervorgegangen:

RAF inhibition overcomes resistance to TRAIL-induced apoptosis in melanoma cells

Berger A, Quast SA, Plötz M, Trefzer U, Eberle J.

J Invest Dermatol, 2012 [manuscript in revision]

Sensitization of melanoma cells for TRAIL-induced apoptosis by BMS-345541 is associated with BAX activation and altered phosphorylation

Berger A, Quast SA, Plötz M, Kammermeier A, Eberle J.

Cell Death and Disease, 2012 [manuscript in press]

Sensitization of melanoma cells for death ligand-induced apoptosis by an indirubin derivative - Enhancement of both extrinsic and intrinsic apoptosis pathways.

Berger A, Quast SA, Plötz M, Hein M, Kunz M, Langer P, Eberle J.

Biochem Pharmacol. 2011 Jan 1; 81(1):71-8

General sensitization of melanoma cells for TRAIL-induced apoptosis by the potassium channel inhibitor TRAM-34 depends on release of SMAC.

Quast SA, **Berger A**, Buttstädt N, Friebel K, Schönherr R, Eberle J.

PloS One 2012; 7(6): e39290

Kunz M, Driller KM, Hein M, Libnow S, Hohensee I, Ramer R, Hinz B, **Berger A**, Eberle J, Langer P

Synthesis of thia-analogous indirubin-N-glycosides and their influence on melanoma cell growth and apoptosis

ChemMedChem 2010 April 6; 5 (4):534–539

ROS and phosphorylation of Bax are essential steps in sensitizing melanoma cells for TRAIL-induced apoptosis by the kinase inhibitor Wortmannin

Quast SA, **Berger A**, Eberle J.

Cell Death and Differentiation, 2012 [manuscript under review]

Bax phosphorylation is the essential steps in sensitizing melanoma cells for TRAIL-induced apoptosis by the mTOR-kinase inhibitor Rapamycin.

Quast SA, Plötz M, **Berger A**, Eberle J.

J Invest Dermatol, 2012 [manuscript in preparation]

Kongressbeiträge

Jahr	Kongress
2012	Cancer Day 2012, Berlin 30. Deutscher Krebskongress, Berlin (Postervortrag) XXXVIII Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF), Marburg
2011	19 th Annual Meeting of the European Cell Death Organization (ECDO), Stockholm, Schweden XXXVIII Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF), Tübingen
2010	20. Jahrestagung Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Onkologie (ADO), Kiel 18 th Annual Meeting of the European Cell Death Organization (ECDO), Ghent, Belgien 33 rd Joint Meeting of the German Society for Cell Biology and the German Melanoma Research Network (<u>Vortrag</u>) 29. Deutscher Krebskongress, Berlin
2009	17 th Annual Meeting of the European Cell Death Organization (ECDO), Paris

Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei Privat-Dozent Herrn Dr. Jürgen Eberle bedanken, der mir das Dissertationsthema zur Verfügung gestellt hat und für Anleitungen sowie in allen wissenschaftlichen Fragen immer zur Verfügung stand. Des Weiteren möchte ich mich bei ihm auch für die kontinuierliche Unterstützung des Projektes, die stete Diskussionsbereitschaft und die hervorragende Betreuung bedanken, die wesentlich zur Ausarbeitung dieser Arbeit beitrugen.

Bei Herrn Professor Uckert bedanke ich mich für die Übernahme der HU-internen Betreuung und für die Unterstützung bei allen Fragen und Problemen, die während der Dissertationsarbeit auftraten.

Herrn Dr. Lothar F. Fecker danke ich ganz besonders für sein technisches Wissen und seine praktische Hilfestellung im Laboralltag.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Annika Quast sowohl für ihre technische und moralische Unterstützung als auch für die fachlichen Diskussionen bedanken.

Außerdem danke ich Giorgios Kokolakis, ohne den die weitere Arbeit nicht möglich gewesen wäre, Frank Braun, Michael Plötz, Conny Schwarz, Katja Steinhorst und allen, die nicht persönlich genannt sind, für die nette Atmosphäre und Hilfe im Labor.

Ich danke auch meinem ehemaligen Biologielehrer Dr. Karlheinz Firtzlaff, der mir die Liebe zur Biologie vermittelt hat und mich mit viel Unterstützung durch das Abitur begleitet hat.

Meinen Eltern, Bärbel und Karlheinz Berger, denen ich nicht genug mit Worten Danke sagen kann, danke ich zutiefst für die bedingungslose und aufopfernde Unterstützung und ihre unermüdliche Geduld. Sie ermöglichten mir dadurch ein sorgenfreies Studieren und Arbeiten.

Ferner danke ich meinem Bruder Markus Berger und dessen Frau Nicole sowie meiner Schwiegermutter Karla Stoppel für die Unterstützung.

Schließlich möchte ich mich bei meinem Mann Matthias Stoppel ganz besonders bedanken, der mich insbesondere emotional unterstützt hat und immer an mich geglaubt hat und mir und meinem Können vertraut hat. Zum Schluss möchte ich auch unseren Kindern Eliza und Maya danken, die oft auf Ihre Mutter verzichten mussten und mich durch ihre Liebe unterstützt haben.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, Anja Berger an Eides statt, die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und alle verwendeten Hilfsmittel und Quellen als solche ausgewiesen habe.

Des Weiteren versichere ich, dass die vorliegende Arbeit nie in dieser oder anderer Form Gegenstand eines früheren Promotionsverfahrens war sowie dass ich mich noch nicht anderweitig um einen Doktorgrad beworben habe bzw. einen solchen bereits besitze.

Die dem angestrebten Promotionsverfahren an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin zugrunde liegende Promotionsordnung ist mir bekannt.

Berlin, den 25. November 2012

Anja Berger